

최 종
연구보고서

식물생존 필수효소 유전자 활용
환경친화형 신규 제초제 후보물질 개발
**Development of environment-friendly herbicide
candidate using the gene of essential enzyme for
plant survival**

한국화학연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물생존 필수요소 유전자 활용 환경친화형 신규 제초제 후보물질 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 13일

주관연구기관명 : 한국화학연구원

총괄연구책임자 : 황 인 택

연 구 원 : 조광연, 김범태, 최정섭, 이관휘,
박은아, 김지혜, 성민정, 장지나,
양희정, 김영삼, 송하영

협동연구기관명 : (주)제노마인

협동연구책임자 : 이 동 희

연 구 원 : 박유신, 김태훈, 전지형, 전영아,
권혜경, 이성화, 장현숙, 김대현,
김국진, 나윤정,

위탁연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 박 재 읍

연 구 원 : 이인용

요 약 문

I. 제 목

식물생존 필수효소 유전자 활용 환경친화형 신규 제초제 후보물질 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

신 의약 및 농약용 생체기능 조절 물질을 개발하기 위해서는 기존의 모방적 screening 방법에서 탈피하여 창조적이며 목표 지향적 신기술이 필요하다. 이를 위해서는 신규 단백질/작용점 탐색이 선행되어야 하며, 생명공학 기술의 적용으로 유전자의 확보 및 유용 기능탐색기술이 필수 불가결함. 전 세계적으로 유용 유전자의 대량 개발 기술이 확립되고 있으며, 이를 통하여 경제 산업적 이용 가치가 있는 유용유전자 발굴과 이들 산물의 전쟁이 가속화 될 것이다. 이러한 기술에 화학물질을 활용하는 것이 chemical genomics이며 생체 기능 조절물질의 개발 기술은 끊임없이 발전 변모하고 있으나 신규 작용점 탐색기술이 승패를 가름하고 있기 때문에 이러한 연구를 통하여 밝혀질 단백질들은 독창적인 신규 작용점이 될 수 있다. 따라서 본 연구과제의 수행 목적은 chemical genomics를 이용하여 신약개발에 있어서 핵심이며, 방향을 결정할 수 있는 신규 단백질/작용점을 발굴하여 기능을 분석함으로써 세계적인 신규 제초제 개발에 적합한 후보물질을 탐색 발굴하는 것이다. 신규 제초제개발을 위한 현대적 스크리닝은 기존방법에 근본적인 틀을 둔 채로, 초기 검색 단계에서 조합화학 및 각종 bank로부터 검색대상 물질을 다량 확보하고, 고효율 검색방법을 통하여 신규 유효물질(hit)을 발굴하고, 유망 선도물질 및 후보물질을 개발하는 것이다. 즉, 신규 작용점(효소/수용체)을 대상으로 수행되는 고효율 검색방법(high throughput screening, HTS)과 조합화학(combinatorial chemical synthesis, CCS)기술이 접목되어 기존의 방법에 비해 수십 배 또는 수백 배의 빠른 속도로 수행할 수 있게 될 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내외적으로 새로운 농약 후보물질을 선별하기 위하여 사용되어 왔던 Me-too 합성 및 임의선발(random screening)로부터 탈피하여 이제는 인체와

환경에 영향을 주지 않으면서 대상 잡초에는 치명적으로 작용하는 신규 제초제를 개발하기 위하여 식물생장 필수효소에 대한 유전정보를 BLAST, TAIR 등의 *Arabidopsis* D/B를 통하여 신규 작용점 후보를 도출하고 도출된 후보 후보유전자의 gene sequence를 확인하고 antisense construct를 제작, Vector와 promotor 및 primer를 제작하여 *Arabidopsis*로 형질전환, T1 종자에 대한 lethality 확인, Lethality를 나타내는 유전자 발현 단백질을 신규작용점으로 확정(식물생장 필수효소), 목표 유전자를 *E. coli*로 형질 전환시켜 배양하면서 단백질을 대량 발현, 발현시킨 단백질을 분리 정제, 단백질(효소)활성 측정방법 개발, 효소의 기질 및 중간체를 합성, 확립된 효소활성측정방법을 간편화시켜 고속약효검색체제로 전환, 화합물은행이 보유하고 있는 45,000여 개의 화합물을 대상으로 hit(활성물질)를 탐색, 발굴된 hit를 대상으로 lead 화합물을 합성, 온실시험을 통한 lead 화합물의 선발, 적용방법(포장시험 포함) 및 작용기전 연구 등을 통한 후보화합물 발굴에 있다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

- 가. 신규 작용점 후보 유전자 결핍 형질전환을 통한 표현형 확인방법을 통하여 식물과 미생물에만 존재하는 biotin synthetic pathway의 첫 번째 단계인 L-alanine과 pimeloyl CoA를 7-keto-8-aminopelargonic acid로 탈카르복실화응축(decarboxylative condensation)시키는 KAPAS synthase(KAPAS)를 신규 작용점 후보로 발굴하였고, 돌연변이 생태형으로부터 치사관련 표적효소를 선발 확정하는 방법을 통하여 lignin 생합성 경로에 관여하는 효소들 중 하위 단계에 존재하는 cinnamylalcohol dehydrogenase(CAD)를 신규 제초제 작용점 후보로 발굴하였다.
- 나. 저해물질 검색체제 구축을 위하여 선정된 목표 유전자(AtKAPAS, AtCAD)를 *E. coli*로 형질 전환시켜 배양하면서 단백질/효소를 대량 발현시켰고, 발현시킨 단백질을 분리 정제하여 단백질(효소)활성 측정방법을 개발하였다.
- 다. KAPAS 저해제와 CAD 저해제를 대량으로 검색하기 위하여 이를 각각 96-well 고속약효검색 체제(HTS, High Throughput Screening)로 변환시켜

HTS system 2개를 구축하였다.

라. KAPAS 활성을 측정하기 위하여 시판되지 않는 기질(Pimelyl CoA)을 자체적으로 합성하였고, 확립된 HTS system을 이용하여 한국화학연구원 화합물은행 대표화합물 및 구매화합물 13,000여개를 대상으로 조사한 결과 활성물질 hit 구조로 Phthalimid계, Phenylsulfamide계, Quinone계를 발굴하였다.

마. 이들 중 Phthalimid계 화합물 120개를 합성하여 잡초 10종을 대상으로 하는 온실스크리닝(잡초발생 전 토양처리, 잡초발생 후 경엽처리)을 수행하였고, 온실시험에서 살초효과가 가장 강하였던 후보화합물을 대상으로 포장시험(농업과학기술원, 위탁시험)을 수행하였다.

바. CAD 저해 후보화합물을 발굴하기 위하여 화합물은행이 보유하고 있는 45,000여개의 화합물에 대한 HTS 검정을 완료하여 10개의 hit를 발굴하였고, 기타 구매화합물 중에서 5개의 hit를 발굴하였다. 이들에 대해서는 유도체 일부(17개)를 합성하여 10종의 잡초를 대상으로 하는 온실스크리닝(잡초발생 전 토양처리, 잡초발생 후 경엽처리)으로 살초효과를 확인하였고, 이어서 KAPAS 저해제와 함께 포장시험(농업과학기술원, 위탁시험)을 수행하였다.

사. 이상의 결과를 신규 작용점 KAPAS에 대한 특허(PCT/KR2003/001301), CAD에 대한 특허(PCT/KR2005/000454)로 출원하였고 KAPAS에 대해서는 미국과 유럽에 등록을 신청하였다.

아. 한편, 독일의 BASF사로부터 KAPAS에 대한 시험을 의뢰받아 한국화학연구원과 10년간의 MOU를 체결하고 15개 화합물에 대한 시험결과를 통보해 주었다.

연구개발결과 활용에 대한 건의

- 지금까지의 연구결과로 신규 작용점에 대한 국제특허출원 2건, 국내특허출원 3건, 해외학술논문(SCI) 3편, 국내학술논문 5편, 국내학술발표 4건을 수행하였다. 이제부터는 후보 화합물에 대한 특허를 출원 및 등록할 시점에 도달하였다.
- 이러한 연구업적을 토대로 신규작용점(PCT 출원 28건)에 대한 점유율은 미국 66%, 영국 14%, 독일(11%)에 이어서 한국 7%를 확보하게 되어 선진국 대열에

동참하게 되었다.

- 21세기 post-genomic 시대에 BT융합 핵심기술을 활용하는 환경친화적인 신규 제초제 개발을 통하여 국내 농약산업의 활성화 전기를 마련하고, 동물에는 존재하지 않는 식물 특유의 효소를 작용점으로 하기 때문에 인체와 환경에 무해한 잡초방제약제를 개발할 수 있게 되었다.
- 그러나 신규 작용점을 대상으로 제초제를 개발하기까지는 최소 5~7년이 소요되는 것이기 때문에 본 과제를 통하여 성취한 결과가 사장되지 않게 하기 위해서는 지속적인 연구사업이 추진되어야 할 것이다.
- 신규 작용점이라는 유용유전자의 지적 소유권을 확보하였기 때문에 이를 발판으로 하여 국내 화학 및 생물산업의 공통 애로기술인 바이오테크놀로지를 이용하는 효능평가 Infra structure 구축으로 신 기업창출 유도 및 환경조화형 작물보호제의 개발을 선도하기 위해서는 1회성의 연구사업 지원체제로 끝나서는 안 될 것이다.
- 따라서 본 연구결과를 출발점으로 하여 신규 제초제의 개발이 완료되는 연구사업이 연속적으로 지원되기를 간절하게 희망하는 바이다.

SUMMARY

This report describes the selection of new environment-friendly herbicide candidate and mining targets among the genes of essential enzyme for plant survival. We performed the identification and validation two kinds of possible target for new herbicide development. The one of 2 noble potential herbicide targets is 7-keto-8-aminopelargonic acid (KAPA) synthase and the other is cinnamylalcohol dehydrogenase (CAD). The partially purified AtKAPAS protein had the enzyme activity fit Michaelis-Menten kinetics for pimeloyl CoA, and a K_m for pimeloyl CoA of about 5.4×10^{-7} M, indicating that the AtKAPAS protein is a KAPA synthase with substrate specificity for pimeloyl CoA. The antisense disruption of AtKAPAS and AtCAD gene cause lethality in the early stage of plant development, respectively. We developed the methods of target enzyme harvesting, isolation, and purification for high throughput screening (HTS) system from cultivation of *E. coli* transformed the gene of each target enzyme. The HTS system for enzyme assay protocol of KAPAS was made from the synthesis of substrate pimeloyl CoA and discovered 3 kinds of hit structure of phthalimid, phenylsulfamide, and quinone for KAPAS inhibition from 13,000 compounds. Among them, 120 phthalimid compounds were tested under greenhouse condition with 10 kinds of weed species according to pre-plant soil and post-foliar application. In addition to this work, experimental agreement for MOU concluded between KRICT and BASF in Germany for KAPAS inhibitor assay. The other hand, 15 kinds of CAD inhibitors were selected from 45,000 compounds. The 17 derivatives were tested to 10 kinds of weed species under greenhouse condition. Herbicide candidates selected from *in vitro* enzyme assay and *in vivo* greenhouse test were performed field trial for conform the herbicidal activity with contract research in National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration. These research results were patented to PCT as "Novel polypeptide having function of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase of plant and method for inducing growth inhibition and lethality by suppressing expression of the polypeptide" and Polypeptide having function of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a polynucleotide coding the polypeptide and those uses.

CONTENTS

Chapter 1. The outline of the research project -----	9
Section 1. The purpose of research -----	9
Section 2. The outline of research -----	11
Section 3. The necessity and scope of research -----	23
Chapter 2. The trend of technology development in the inside and outside of the country	
Section 1. The essential requisite for new crop protectant -----	26
Section 2. The direction of new target search -----	34
Section 3. The analysis of patents for new target -----	38
Chapter 3. The content of research and results -----	41
Section 1. The selection of new herbicidal target -----	41
Section 2. The research for KAPAS -----	49
Section 3. The research for CAD -----	82
Section 4. The development of herbicide candidate -----	103
Chapter 4. The degree of accomplishment and contribution to associated fields ----	129
Section 1. The degree of accomplishment -----	129
Section 2. The contribution to associated fields -----	130
Chapter 5. The plan of research results application -----	132
Section 1. The results of research -----	132
Section 2. The plant of application -----	134
Chapter 6. The collected information during research procedure -----	136
Section 1. The analysis of old target patents -----	136
Chapter 7. The sited literature -----	151

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	9
제 1절 연구개발의 목적 -----	9
제 2절 연구개발의 개요 -----	11
제 3절 연구개발의 필요성 및 범위 -----	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	26
제 1절 신규 작물보호제 구비조건 변화 -----	26
제 2절 신규 작용점 발굴 방향 -----	34
제 3절 신규 작용점에 대한 특허분석 -----	38
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	41
제 1절 신규 작용점 후보 선발 -----	41
제 2절 신규 작용점 KAPAS에 대한 연구 -----	49
제 3절 Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase(CAD) 연구 -----	82
제 4절 후보화합물 발굴(온실 및 포장시험) -----	103
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	129
제 1절 목표 달성도 -----	129
제 2절 관련분야에 대한 기여도 -----	130
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	132
제 1절 연구개발결과 -----	132
제 2절 활용계획 -----	134
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	136
제 1절 기존 작용점에 대한 특허분석자료 -----	136
제 7 장 참고문헌 -----	151

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

제초제가 일반적으로 광범위하게 사용된 것은 1940년대 후반부터이고, 그 동안 식량생산성 증대에 중대한 역할을 해왔다. 우리나라는 1950년대부터 80년대 초까지 실시된 강력한 식량증산정책에 힘입어 농약의 사용량이 급속히 증가해 왔으며 이와 함께 농약업계는 기존시설을 개선하는 한편 선진국과의 기술제휴 등으로 상당한 기술축적을 이루어 외국산원제의 수출량 또한 많이 증가되어 왔다. 그러나 하나의 새로운 농약을 개발하기 위해서는 화합물의 생물활성을 검정하고, 약효, 약해 및 각종 독성시험 뿐만 아니라 제법개발, 시장성 및 경제성 등을 조사하는데 평균 10년 이상이 소요되며 200억-400억 원 정도의 개발비가 투입 된다(松中, 2000, 황 등, 2001b). 더욱이 지금까지 제초제를 합성하여 상품화 할 수 있는 확률은 평균 20,000분의 1밖에 되지 않아 투자액과 금리 등을 고려한다면 농약산업은 큰 위험부담을 안고 있는 산업이기 때문에 대부분의 국가들이 아직도 새로운 제초제를 개발하지 못하고 선진국에서 개발한 원제를 수입, 사용하고 있는 실정이다(한국정밀화학총람, 2001).

신규 제초제의 개발은 산업적인 차원에서 높은 부가가치, 독점적인 권리행사가 가능한 지적소유권 확보 등을 목적으로 선진 다국적 기업들이 확대 통합하고 있다(정 등, 2001). 선진국기업이 새로운 제초제 하나를 개발하여 확보한 수익은 오래 동안 지속되었기 때문에 우리나라와 같이 영세한 산업구조 속에서는 제초제를 포함한 농약산업을 단순히 회사나 이익단체만이 해결해야 한다는 시각에서 탈피하여 국가전략산업으로서 그 중요성을 제고하여야 할 것이다. 또한 21세기 post-genome 시대에는 유용 기능 유전자의 확보와 이를 이용하는 산업화 경쟁이 더욱 치열해질 전망이다. 세계적인 신규 제초제의 개발에 있어서도 신규 작용점 탐색이 승패를 결정하게 될 것이다. 이러한 제초제의 신규 작용점 탐색과 새로운 구조의 제초제 개발은 저항성 잡초의 관리는 물론 살초 스펙트럼의 확대, 신규 물질특허와 시장개척, 인축에 안전하고 환경 친화력을 증대시키는데 절대적으로 필요하다. 즉, 제초제는 식량 확보에 필요한 작물보호 약품으로서의 기능과 30조원의 세계 농약시장에서 50.8%를 점유하고 있는 정밀화학제품으로서 국가적인 전략사업으로서의 기능을 동시에 가지고 있다는 것을 인식하여야 할 것이다(황 등, 2001a).

그 동안 신규 제초제의 개발 기술은 끊임없이 발전 변모하여 왔으며, 창조적인 기능검색 체제와 목적 지향적인 합성기술이 개발되어 기존의 모방적인 방법에서 벗어나 환경 친화성 제초제의 개발체제를 구축하고 있다. 즉, 기존의 화학물질과 작용점을 대상으로 하는 me-too 합성과 random 스크리닝 방법이 지금까지 추진해 왔던 생리활성 조절물질 개발 방법이었으나 신규 작용점의 부재로 인한 안전성 및 환경오염 문제의 대두로 한계점에 봉착하였고, 이를 극복하기 위하여 새로운 기술이 절실하게 요구되고 있다(Schloss and Aulabaugh, 1990; Saari, 1999; Rendina et. al. 1994.). 특히 post-genome 시대의 정보를 적극적으로 활용하는 분자생물학과 생화학적 접근에 의한 new target 탐색 및 조절물질 개발이 필수적이며, 작용점에서의 효소/수용체를 대상으로 수행되는 고효율 검색방법(high throughput screening, HTS)과 조합화학(combinatorial chemical synthesis, CCS)기술이 접목되어 기존의 방법에 비해 수십 배 또는 수백 배 빠른 속도로 수행할 수 있게 될 것이다(Broach and Thorner, 1976; 畑中, 2000; Hess et al. 2001).

신규 제초제의 개발을 위해서는 target enzyme의 선택과 결정, 저해제의 설계, 저해제의 작용점까지 이동, 대사적인 운명 등 여러 가지 요인들을 검토하여야만 한다. 이러한 과정에서 얻어지는 다양한 생화학적 정보는 작용점/효소의 저해로부터 고사에 이르는 과정을 이해함은 물론 보다 강력한 저해제의 개발과 살초과정을 이해할 수 있게 될 것이다. 이러한 과정에서 가장 중요한 것은 확실한 작용점의 선택에 있다.

따라서 본 연구의 목적은 21세기형 제초제 개발을 위한 신규 작용점의 개발과 이를 목표로 하는 신규 제초제 후보물질을 개발하는 데 있다. 만일 막대한 양의 유전자 정보를 활용하여 생명현상을 해석하게 될 시발점에서 유전자 정보를 활용하지 못하면 영원한 기술 예측 국으로 전락하게 되어 다국적 기업의 판매시장 신세를 면하지 못하게 될 것이다. 이는 차세대 신 물질개발의 유일한 돌파구로써 세계의 여러 다국적 기업들은 이미 본 연구사업에 착수함으로써 본 사업에 대한 정부지원의 타당성과 시급성이 강조된다. 이러한 접근방식은 신약개발에 있어서 세계적으로 앞선 기술이기 때문에 시간을 다투어 추진되어야 하며, 고급인력과 지식활용 특성상 우리나라 여건에 적합하여 집중적인 투자가 이루어진다면 단기간 내에 선진 7개국의 수준으로 catch-up이 가능한 분야이다.

제 2 절 연구개발의 개요

일반적으로 새로운 제초제를 개발하기 위해서는 후보물질의 탐색과 최적화 작업으로부터 시작되는데, 후보물질 선별은 다음과 같은 세 가지 접근방식에 의해 추진되어 왔다. 첫째, 새로운 화합물에 대한 임의선발(random screening), 둘째, 기존의 제초제나 제초활성이 확인된 천연물질을 새로운 물질합성의 선도물질로 이용하는 방식, 셋째, 주요 대사과정에 대한 특정 저해제의 합리적 설계(rational design) 등이다(松中, 2000; Schloss and Aulabaugh, 1990; Saari, 1999; Rendina et al. 1994). 그 동안 개발된 제초제의 대부분이 고전적 약효검색 방법을 통해서 개발되었다. 그러나 고전적인 방법은 실험재료 확보를 위한 재배시설, 장비, 넓은 공간과 많은 인원이 필요하기 때문에 단순화, 표준화하려는 노력이 진행되어 왔다. 이러한 방법으로는 약효검색 결과를 얻기까지 일정기간이 요구되기 때문에 유도체 합성에 시험 결과를 즉각적으로 이용 할 수 없고, 복잡 다양한 생육환경의 유지 곤란, 검색 가능화합물질의 수 등이 제한요소이었다. 이를 개선하기 위하여 소개된 biorational approach 방법이 작용점을 대상으로 화합물을 합성하게 되었다. 대표적인 예로 광합성 전자전달계를 저해하는 제초제 개발은 광합성 전자전달이 일어나는 식물체의 thylakoid membrane 조직만을 추출해서 광 조건하에서 전자전달과정의 저해능력을 조사하고, 활성이 높은 화합물에 대해서는 다시 세포수준에서 저해활성을 측정한다. 이어서 조직과 전체식물로 대상을 확대하는 방법으로 실험실 규모에서 대량의 화합물을 짧은 시간 내에 검색할 수 있다는 장점을 가진다(Saari, 1999; 황 등, 1993a,b). 최근에 소개된 또 하나의 방법은 고효율 검색방법(high throughput screening, HTS)이다. 이는 biorational approach 방법으로부터 일보진보한 것으로써, 기존의 알려진 작용점 또는 가능한 작용점 효소/수용체를 대상으로 수행하는 방법이며, 조합화학 기술과 접목되어 대부분의 과정이 로봇에 의해 수행될 수 있도록 설계된다는 것이다(Broach and Thorner, 1976; 畑中, 2000; Hess et al. 2001). 이러한 방법으로 약효검색을 수행한다면 기존의 방법과는 비교할 수 없을 정도로 많은 화합물을 신속하게 검정할 수 있다. 그러나 이러한 방법들은 실제 환경의 대상 식물에 대해서 *in vivo* 적용시험을 수행해야만 하기 때문에 고전적인 방법의 시설과 장비는 기반기술로 유지되어야만 한다. 따라서 새롭게 개발되는 biorational approach와 HTS 등은 수많은 후보물질 중에서 활성이 없는 화합물을 일차적으로 제거하고 활성이 높은 화합물만을 대상으로 적용시험을

수행하기 때문에 시간과 경비, 노동력을 크게 절감시킬 수 있다는 장점이 있다. 그러나 선발된 후보화합물이 작용점/효소에 대하여 높은 저해활성을 가지고 있다고 할지라도 대상 식물에 대한 방제효과와 반드시 일치하지 않으며, 때로는 모핵 화합물이 식물 체내에서 분해 또는 변화되어 활성을 나타내는 pro-pesticide도 있다는 점을 감안하면 고전적인 방법의 중요성을 인정하지 않을 수 없다. 이와 같이 *in vitro* 시험에서 작용점/효소를 강력하게 저해하는 물질이 *in vivo* 시험조건에서 효과를 나타내지 못하는 원인은 후보물질이 작용점/효소까지 전달되지 못하는 것과, 대상 작용점/효소가 제초제 개발에 적합하지 못하기 때문이다. 따라서 신규 제초제를 개발하기 위해서는 작용점/효소 선발에 신중을 기해야 하며, 선발된 후보화합물을 실용화시키기 위해서는 작용점까지 신속하게 도달할 수 있도록 가공하는 최적화 기술이 수반되어야 한다(Fig. 1-2-1).

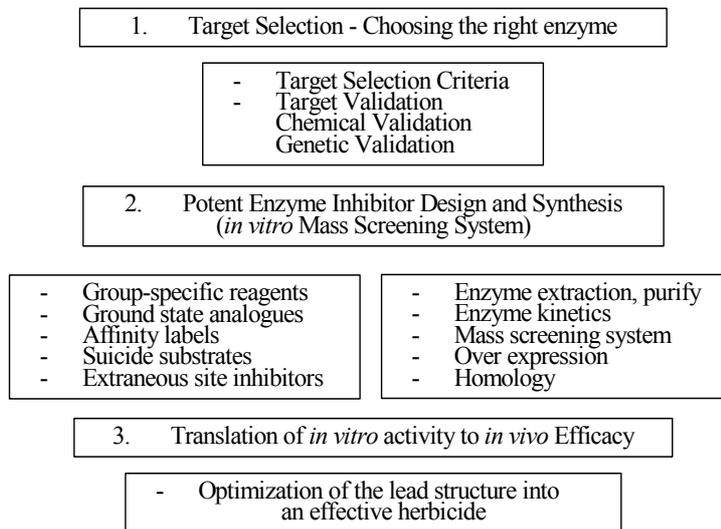


Fig. 1-2-1. Designing the target directed herbicides.

유전자 발굴을 통한 신규 작용점 탐색

식물 기능성 유전체 연구는 1) 식물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 제한하여 신 기능성 형질 전환 식물을 창제하거나 2) 이 기술을 대량으로 적용하여 원하는 형질의 식물체를 선발하거나 3) 식물 유전자들의 식물체내 기능을 대량 확인하는 데 이용되는 유전자 기능 확인 및 유용 유전자를 발굴하는 연구로서

현재의 일반적인 식물 생명공학 산업의 제 분야 즉, 신품종 개발 산업, 식품산업, 화학공업 등에 사용되고 있는 기반 기술이며, 향후 이러한 산업의 지속적 발전 뿐 아니라 유망 산업인 환경 정화 및 치유 산업, 식물 유래의 약품 및 specialty chemical 산업의 발달에는 식물 유전자 기능의 이해와 신 기능성 유전자의 발굴 및 이용이 중요한 관건으로 이를 위해서는 식물 기능성 유전체 연구가 필수적이다. 미국에서는 이미 "The 2010 Project"를 통하여 유전자 기능연구를 적극적으로 추진하고 있다(Chory, 2000). 유전자의 분리와 그 기능을 확인하는 효과적인 방법 중의 하나인 cDNA sequencing과 기존의 mutagenesis 방법이 활용되고 있는데 이들이 가지는 한계를 극복하면서 새로운 유용 유전자를 확인, 분리할 수 있는 신기술로 식물체내 유전자를 무작위로 파괴시킨 변이체를 대량 생산하고 그 기능을 확인하는 random antisense mutagenesis (RAM) 기술을 세계 최초로 포항공대와 (주)제노마인에서 개발하여 활용하고 있다(Fig. 1-2-2, 1-2-3).

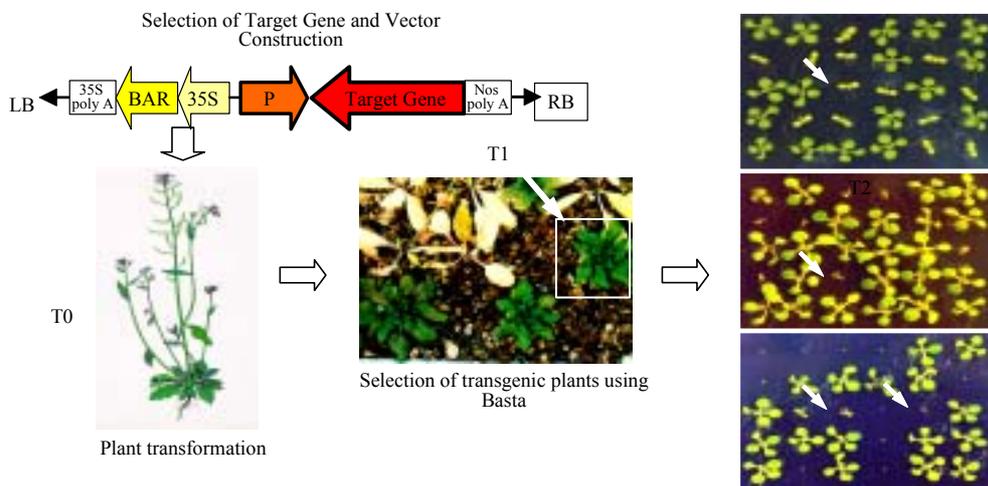


Fig 1-2-2. The principle of antisense approach in the reverse genetics.

(from GenoMine Inc.)

기능성 유전체의 이용분야 중에서 식물기능 조절 물질의 개발 분야에 RAM 기술을 접목시키는 것은 세계적으로 앞서가는 첨단기술이며 신규 제초제가 개발된다면 개발된 제초제의 독점 사용권을 행사할 수 있고, 이를 이용한 저항성 품종개발,

응용 분야 확대적용 등을 통하여 세계적인 제초제의 시장진입과 함께 제 2의 제초제 저항성 작물을 출시할 수 있는 기틀이 되는 것이다. 인체에 대한 유전체 연구는 물론 식물에 대한 유전체 연구에서도 창의적 과학 기술이 인간의 삶에 유용하게 이용되게 하기 위해서는 유전자 지도가 작성되고, 기능을 확인하여 목적에 알맞게 조절할 수 있어야 한다. 따라서 최종적으로는 유용한 기능을 조절할 수 있는 조절물질의 개발이 필요하게 된다. 기능을 유용하게 활용할 수 있는 유전체 연구가 진행되지 않았던 과거에는 이러한 분야의 연구가 불가능하였지만, 수많은 유전자 정보가 제공될 미래에는 유전자의 기능을 파악하고 조절하는 분야가 어떠한 분야보다 활발하게 추진될 것이다. 따라서 유용 기능성 유전자 발굴 기술인 RAM approach를 통하여 유용 기능성 유전자 자원을 대량으로 발굴하고, 이를 이용하여 독창적이고 강력한 생체기능 조절물질을 개발하고자 하는 연구가 한국화학연구원과 (주)제노마인에서 공동으로 진행되고 있다. RAM을 통하여 발굴되는 유전자의 기능은 매우 다양하기 때문에 이를 확인하고(Fig. 1-2-3), 기능을 조절할 수 있는 화학물질을 개발한다는 것은 식물기능 화학조절의 차원에서 무한한 가치를 창조할 수 있을 것이다. 따라서 앞으로는 식물체에만 존재하면서 환경 친화적인 신규 식물기능 조절물질과 제초제만이 세계적인 시장을 확보 할 수 있으며 이는 시간을 다투는 중요한 연구인 것이다. 특히 antisense approach 기법을 이용한 신규작용점 탐색 방법은 유전자 기능을 기초로 출발하는 목표 지향적 접근방식이기 때문에 그동안의 모방적 창출에서 독창적 신규 식물기능 조절물질 개발의 신기원이 될 것으로 확신한다(Tang and Sturm, 1999; Zou et al., 1999; D'Aoust et al., 1999; Bourque, 1995). 신규 작용점을 탐색하는 유전공학적 방법으로서 다른 하나는 신규 작용점으로 유망한 것들을 대상으로 접근하는 방법이다. 아무리 많은 후보 작용점이 존재한다 하여도 작용점이 결핍된 식물체가 성장을 하지 못하거나 죽지 않는다면 제초제로서의 작용점이 될 수 없다(Abell, 1993, 1996; Höfgen, R. 1994, 1995, 1998; 황 등, 2000).

이를 확인하기 위해서는 작용점/효소를 저해하는 것으로 이미 알려진 화학물질을 처리하여 확인할 수 있으나 식물체내에서 화학물질이 변화되거나 작용점까지 도달하지 못하는 경우에는 확인할 수가 없다. 이를 해결하기 위해서는 유망 후보 작용점의 유전자 분석을 통하여 확인된 유전자를 antisense기법으로 형질전환 시킨 식물체를 만들었을 때 식물체가 나타내는 결과를 통하여 작용점을 탐색하는 것이

다. 즉, 정상적인 식물체의 필수 유전자의 일부를 역방향으로 삽입시켰을 경우 식물체가 죽게 된다면 동일 유전자가 발현하는 단백질/효소의 기능을 억제하는 화학물질을 제초제로 개발하여 처리한다면 필수 유전자 발현 단백질이 만들어지지 않기 때문에 식물체는 반드시 죽게 될 것이다 (Fig. 1-2-4).



Fig. 1-2-3. Examples of morphological mutants obtained by RAM Group, GenoMine. Phenotypic characteristics represent as follows: (a) callus-like form after germination, no hypocotyl, no true leaf, pseudo-flowering and lethal-like, (b) bushy and compact form, multi rosette leaves, growth retardation and low fertility, (c) dwarf, compact cotyledon and leaf, absence of petioles, short stem, a prolonged vegetative phase, a delayed senescence and severe reduction in fertility, (d) rose form in leaf shape, compact cotyledon and leaf and no petioles, (e) downward flowering and helix-like inflorescence, (f) bushy and compact form, multi rosette leaves, a twist in inflorescence and low fertility. (from GenoMine Co.)

작용점 지향적 후보물질 탐색

RAM approach를 통하여 확보한 유전자의 기능을 확인하거나, antisense 기법을 이용하여 신규 제초제 작용점을 선정한 이후에는 강력한 저해물질을 탐색하여야 한다(Fig. 1-2-4). 이를 위해서는 효소를 대상으로 하는 활성 검정방법이 확립되어야 하고 여러 가지 접근방법을 동원하여 후보물질을 확보하여야 한다. 이 때 후보물질을 합성하기 위해서는 선도물질이 필요하게 되는 데 신규 작용점일 경우에는 선행 연구결과가 없거나 많지 않다. 따라서 대상 작용점의 기능 조절 선도물질에 대한 정보가 전혀 없는 경우에는 효소의 결정구조를 이용하거나 효소의 작

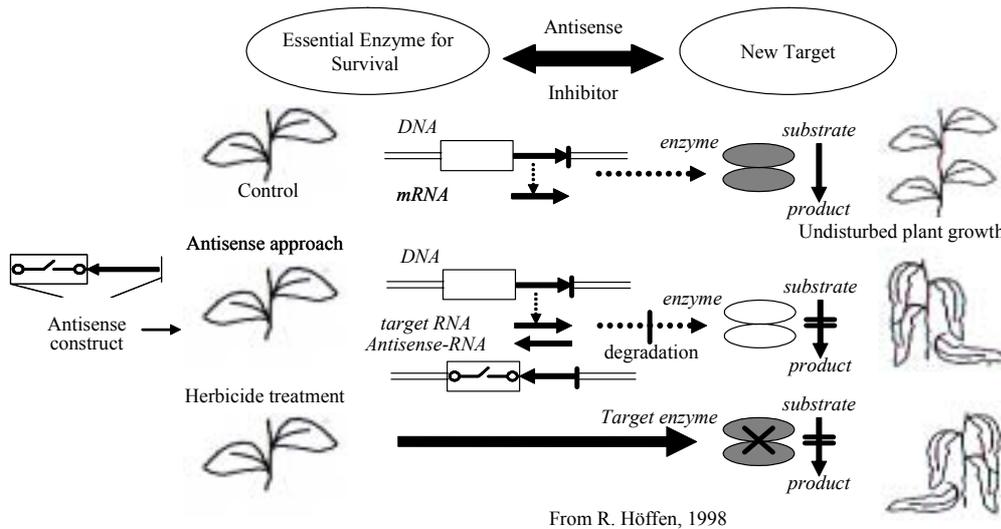


Fig. 1-2-4. Antisense technology for target validation.

(from Höffen. 1998)

용기전 연구에서 얻은 정보를 활용하여 조절물질을 설계하고 합성하여야 한다. 또한 화합물은 행이 보유하고 있는 많은 화합물을 이용하여 새로운 정보를 확보하거나 이미 알려진 각종 효소 저해물질(천연물 포함)을 활용할 수도 있다(Abell et al., 1993; Abell, 1996)

목적 지향적인 후보 화합물 합성과정에서 잘 알려진 작용점을 대상으로 할 경우에는 기존의 조절물질을 기본으로 하여 합성하기 때문에 새로운 물질을 도출하기 쉽다. 그러나 이를 상품으로 개발하기 위해서는 효력과 비용 면에서 기존물질과 차별성을 가지지 않으면 안 된다. 또한 동일한 작용점을 가진 제품들이 사용되고 있다면 새롭게 개발한 상품이 시장에 진입하기도 전에 저항을 받게 될 수 있다. 이와 달리 새로운 작용점을 목표로 하는 선도물질 개발은 상대적으로 어렵다. 그러나 훌륭한 작용점을 선정하게 되면 대체적으로 다음과 같은 방법으로 접근하게 된다(Abell et al., 1993; Abell, 1996; Saari, 1999; Rendina et. al. 1999). 먼저 공통특이시약(group specific reagents)을 활용하게 된다. 이는 단일 효소 특이성은 부족하지만 반응계에서 필요로 하는 기질, 조 효소 등이 가지고 있는 공통적인 결합잔기(binding residue)의 구조를 바탕으로 화합물을 합성하는 것이다. 대표적인 예로서 chloroacetamide계 화합물들은 분자내의 chloromethyl기가 식물체내 단백질

의 nucleophilic group과 치환반응을 일으키거나 coenzyme A와 수종의 단백질을 alkyl화시키는 것으로 알려져 있다(Fig. 1-2-5).

Chloroacetamides - Group Specific Reagents (?)

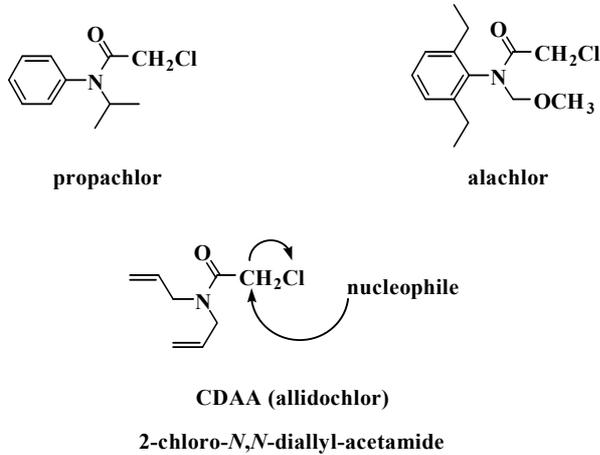
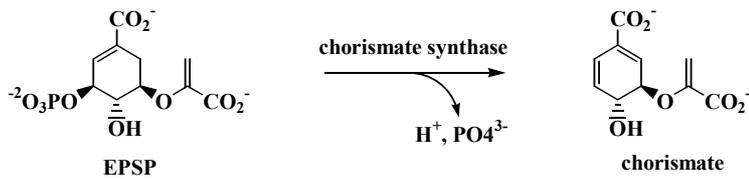
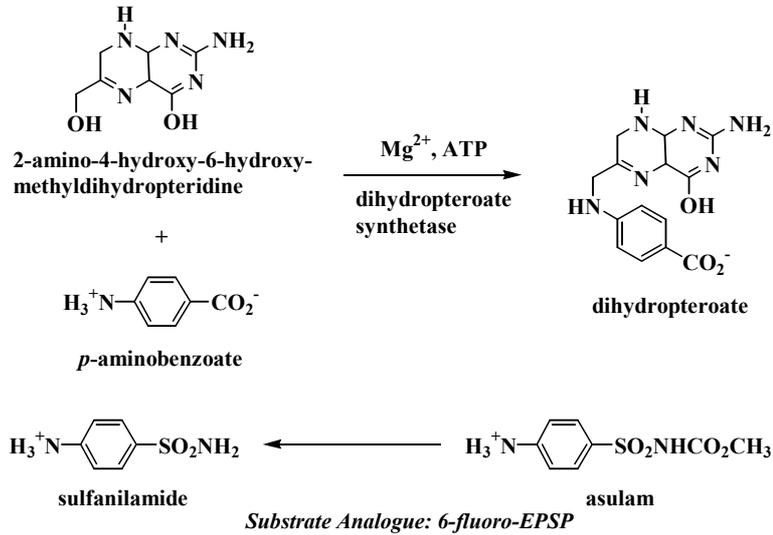


Fig. 1-2-5. Chloroacetamide herbicides-possible group specific reagents.
(from Abell et al., 1993)

따라서 chloroacetamide계 제초제의 작용점이 아직까지 분명하게 밝혀지지 않고 있으며 다수의 작용점을 가지고 있는 것으로 여겨지고 있다. 두 번째로는 기질, 생성물, 조효소, allosteric effectors 등의 유사체 합성(ground state analogues)이다. 이렇게 합성한 화합물들은 특정효소에만 특이적으로 작용하게 되며 대표적인 2가지 화합물 methyl-(4-aminophenyl sulphonyl) carbamate (asulam)과 6-fluoro-5-enol pyruvyl shikimate-3-phosphate(6-fluoro-EPSP)를 예로 들 수 있다(Fig. 1-2-6). 세 번째로는 affinity labels로서 이는 상기 두 가지 특성을 모두 갖도록 합성하는 것이다. 예를 들어 acivicin이라는 화합물은 glutamine 구조 유사체이면서 anthranilate synthase와 glutamate synthase 등을 포함한 glutamine-dependent amino transferase의 cysteine 잔기를 alkyl화시킴으로써 효소를 불활성화 시킨다(Fig. 1-2-7). 네 번째로는 suicide substrates, irreversible inhibitors, kcat inhibitors, Trojan horse reagents 등으로 표현되는 화학물질로 처음에는 기질과 가역적인 결합을 이루지만 시간이 경과하면서 주변의 아미노산 잔기와 추가적인 결합을 하여 불가역적인 상태로 전환되는 것이며 대표적인 예로서 cystathione- β -synthase를 불활성화 시키는 propargyl

glycine이 있다 (Fig. 1-2-8). 다섯 번째로 반응 중간산물 유사체 (reaction intermediate analogues)의 합성이다. 이는 특정 작용점에 대한 선택적 조절물질을 탐색하기 위하여 유용하게 사용되는 방법이다. 이렇게 합성한 물질들은 특정 효소에 대한 선택적 기능 조절효과가 매우 높다.

Ground State Analogues



Proherbicide:

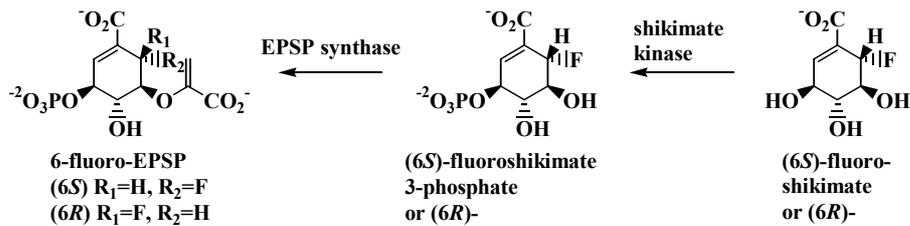


Fig. 1-2-6. Examples of ground state analogue inhibitors for dihydropteroate synthetase (top) and chorismate synthase (bottom). (from Abell et al., 1993)

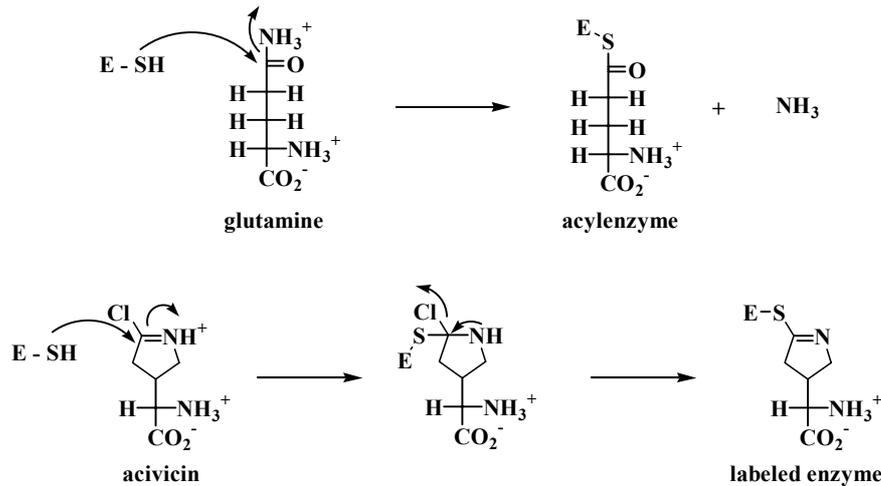


Fig. 1-2-7. Acivicin: an example of a label for glutamine-dependent amidotransferases. (from Abell et al., 1993)

왜냐하면 효소와 기질의 반응을 통한 화학적 전이과정에서 반응 중간산물과 효소의 결합력은 기질이나 생성물과의 결합력보다 훨씬 크기 때문이다(Fig. 1-2-9). 마지막으로 extraneous site inhibitors의 합성으로 이는 가장 최근에 인식된 방법으로 대표적인 화합물은 많이 알려진 acetolactate synthase와 acetyl CoA carboxylase 저해 물질들로서 효소의 주된 활성부위에 결합하지 않고 측면 부위에 부분적으로 결합하기 때문에 대상 효소의 작용특성 연구를 통해서도 후보화합물을 예측할 수 없지만 아주 적은 양으로서 높은 효과를 나타낸다(Fig. 1-2-10). 그러나 저항성이 빨리 나타날 수 있다는 단점을 가지고 있다. 이상과 같이 소개한 여러 가지 방법 중에서 가장 바람직한 것은 extraneous site inhibitors의 합성이지만 반응 중간산물 유사체를 합성하는 것도 효과적이다. 또한 이렇게 합성한 후보물질들은 대상 효소에 대해서는 매우 선택적으로 작용하지만, 대상 효소를 보유하고 있는 모든 식물체에 대해서는 비선택적으로 작용하게 될 것이다. 그러나 작물과 잡초에 대한 선택성은 대부분이 식물체 내에서의 대사과정에 기인하는 것이기 때문에 최적화작업을 통하여 선택성과 적용작물을 선정할 수 있게 된다. 선택성이 발현되지 않는 화합물의 경우에는 비선택성 제초제로 개발하게 되며, 이는 유전공학적인 기술을 통하여 Round-up ready 작물과 같이 국산 제초제 저항성 작물의 생산 가능성을 더욱 높게 해주는 것이다.

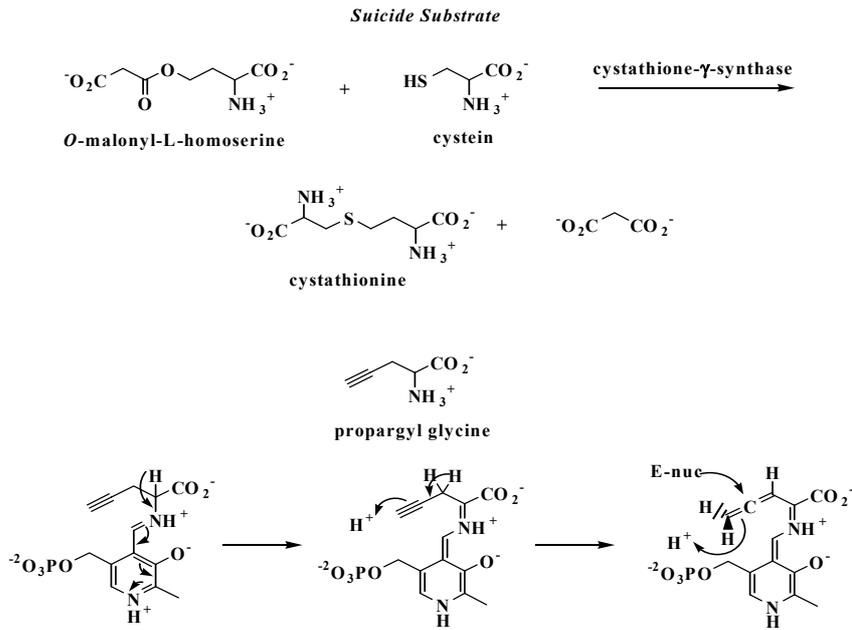
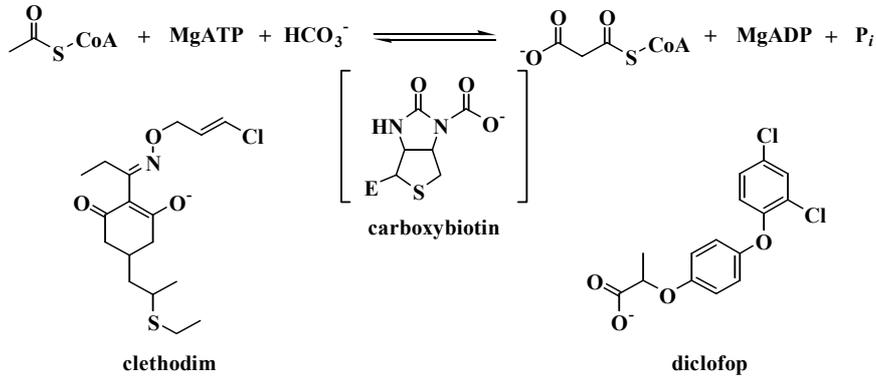


Fig. 1-2-8. An example of a suicide substrate: propargyl glycine and the postulate mechanism of inactivation of cystathionine- γ -synthase.
(from Abell et al., 1993)

신규 제초제 작용점의 발굴에는 유전체학, 조합화학, 유전체 정보학 등 새로운 기술이 등장하여 수많은 화합물과 유전자의 조합으로 그 가능성이 높아지고 있다. 대략 10^{30} 에서 10^{50} 개의 화합물질이 존재하고 50,000여 개의 식물 유전자 지도가 완성되고 있기 때문에 앞으로는 새로운 제초제의 작용점 발굴 가능성이 높아지게 될 것이다. 그 동안에는 알려진 작용점의 특성을 이용하여 왔지만 최근에는 antisense 기법을 활용하는 기술이 치사관련 작용점을 찾아내는데 잠재력과 가능성을 확대시켜주고 있다. 치사관련 작용점을 발굴한 후에는 대상효소의 화학적, 생화학적 기능과 단백질의 구조를 분석하여 강력한 저해제를 설계하는데 활용하게 된다. 대상 효소에 대하여 다양한 형태의 저해제들이 설계될 수 있지만, 치사관련 돌연변이체와 antisense 기법을 활용하고, 식물 생리학적 반응을 기초로 하여 리드화합물을 탐색하는 것은 새로운 접근방식이다. 농약 화학적 특성을 갖는 효소 저해제들의 합성은 크게 6가지로 요약할 수 있다. 공통특이시약, 기질 유사체 합성, affinity labels, 자살기질체, 반응중간산물, 그리고 extraneous site inhibitors 등을 들

Extraneous Site Inhibitors

ACC (acetyl-CoA carboxylase):



KARI (ketol acid reductoisomerase):

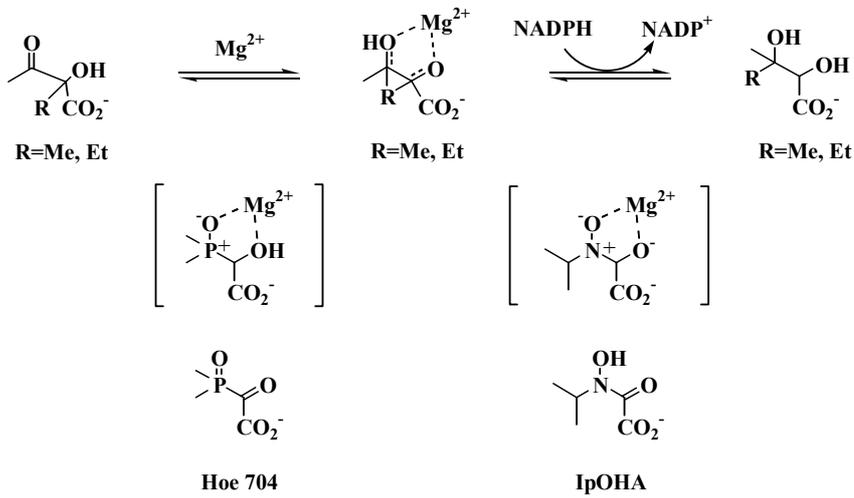


Fig. 1-2-9. Examples of reaction intermediate analogue inhibitors of ketol acid reductoisomerase (top) and glutamine synthetase (bottom).

(from Abell et al., 1993)

수 있다. 후보화합물이 선발된다 하여도 실제 식물에 처리하여 흡수, 이행, 대사 등에 관한 시험이 반드시 이루어져야 한다. 약물의 전달과정과 무독화 작용을 통하여 pro-herbicide에 대한 연구를 진행하게 되며 마지막으로 잡초와 작물간의 선택성이 고려되어야 효소 특이적 접근방식에 의한 신규 제초제의 개발이 성공할 수

있는 것이다.

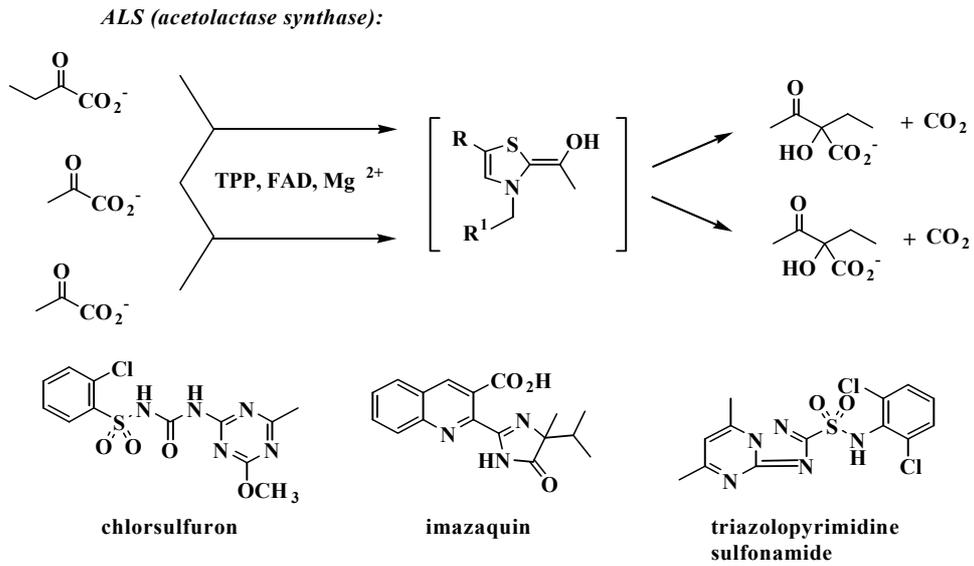


Fig. 1-2-10. Examples of extraneous site inhibitors: acetyl-CoA carboxylase (top) and acetolactate synthase (bottom). (from Abell *et al.*, 1993)

제 3 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

1) 신규 제초제개발을 위해서는 신규기술 개발이 필수적 요건

신규 제초제개발을 위한 현대적 스크리닝은 기존방법에 근본적인 틀을 둔 채로, 초기 검색 단계에서 조합화학 및 각종 bank로부터 검색대상 물질을 다량 확보하고, 고효율 검색방법을 통하여 신규 유효 물질(hit)을 발굴하고, 유망 선도물질 및 후보물질을 개발하는 것이다. 즉, 신규 작용점(효소/수용체)을 대상으로 수행되는 고효율 검색방법(high throughput screening, HTS)과 조합화학(combinatorial chemical synthesis, CCS)기술이 접목되어 기존의 방법에 비해 수십 배 또는 수백 배의 빠른 속도로 수행할 수 있게 될 것이다.

2) 유전자 발굴을 통한 신규 작용점 탐색기술 개발

식물체가 보유하고 있는 유전자 가운데 신규 제초제의 작용점으로 활용할 수 있는 유전자의 확률이 0.1%라면 50개, 1%일 경우 500개, 10%일 경우 5,000개의 신규 작용점이 새롭게 탐색될 수 있을 것이다. 따라서 전 세계적으로 유전체 연구가 급속도로 진행되고 있고 *Arabidopsis thaliana*의 유전자 분석이 모두 끝났기 때문에 신규 제초제 개발을 위한 작용점 탐색 분야에 기능성 유전체 연구가 집중될 것이다.

나. 경제·산업적 측면

1) 신규 제초제개발은 장기 수익산업 품목

선진국기업이 새로운 제초제 하나를 개발함으로써 확보한 수익은 오래 동안 지속되기 때문에 Monsanto 사의 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase(EPSPS)라는 방향족 아미노산 합성효소를 특이적으로 저해하는 glyphosate (Round-Up)와 같이 20~40년 이상의 장기간 수익산업의 기초를 다지게 될 것이다.

2) 신규 제초제 개발은 세계적인 차세대 중점사업

신규 제초제 개발은 식량안보의 차원에서 식량생산성 향상을 위한 작물보호 약품으로서의 기능과 15조원 세계시장을 공략할 수 있는 정밀화학 전략사업으로서의 기능을 동시에 가지고 있다. 따라서 사람과 동물에 대한 독성이 낮고, 환경보존에 대한 중요성이 강조되는 현실에 알맞은 신규 제초제 개발은 세계적인

차세대 중점사업이 될 것으로 예측할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

1) 식물에만 특이적으로 존재하는 신규 작용점 발굴이 성공의 열쇠

신규 제초제를 개발하기 위해서는 지금까지 개발되지 않았고, 동물에는 존재하지 않으면서 식물에만 특이적으로 존재하는 작용점 탐색이 승패를 가름하고 있다. 이러한 시점에서 본 연구과제가 추구하고자 하는 “식물생존 필수효소 유전자 활용 환경친화형 신규 제초제 후보물질 탐색”은 세계적으로 앞서가는 신기술인 antisense기법을 활용한 식물기능성 유전체 연구를 통하여 식물체에만 존재하는 식물생존 필수효소/단백질을 탐색하고, 이에 대한 조절물질을 발굴하는 데 30,000개 이상의 화합물은행과 각종 유기합성 화합물을 이용하게 된다. 또한 고전적인 온실스크리닝 기술에 고속 약효검색기술을 접목시켜 새로운 식물생장조절물질(제초제)을 개발하는 것으로, 유전자 기능을 기초로 출발하는 목표 지향적 접근 방식이므로 그 동안의 모방적 창출에서 독창적 신규 제초제 개발의 신기원이 될 것으로 확신할 수 있다. 따라서 본 과제는 경제 산업적 이용가치가 있는 유용유전자 발굴과 조절물질의 개발전쟁이 가속화 될 미래를 개척하기 위해서 절대적으로 필요한 차세대 중점연구인 것이다.

2. 연구개발의 범위

가. 식물생장 필수효소에 대한 유전정보를 BLAST, TAIR 등의 *Arabidopsis* D/B를 통하여 신규 작용점 후보 도출

나. Antisense 기법으로 식물 기능성 유전체 연구를 통한 신규작용점탐색

다. 후보화합물 탐색 및 고속약효검색기술 개발

라. Target-directed synthesis를 통한 후보 화합물 생산

마. 적용방법(포장시험 포함) 및 작용기전 연구

이상과 같은 일련의 연구개발방법 및 설계는 세계적으로 처음 수행하는 방법이 기 때문에 상황에 따라 다소간 변화될 수 있으며, 신규 제초제가 개발되는 데에는 최소 10년 이상 필요 하다는 것은 교과서적인 사실이므로 제초활성 신규물질의 발굴과 이의 확인까지가 본 과제의 최종 목적인 것이다.

3. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> - Antisense 기법을 활용한 식물 기능성 유전체 연구 - 작용점 선정 및 저해물질 검색체제 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 식물생장 필수효소에 대한 유전정보를 BLAST, TAIR 등의 <i>Arabidopsis</i> D/B를 통하여 신규 작용점 후보 도출 - 후보유전자의 gene sequence를 확인하고 antisense construct를 제작 - Vector와 promotor 및 primer를 제작하여 <i>Arabidopsis</i>로 형질전환 - T1 종자에 대한 lethality를 확인 - Lethality를 나타내는 유전자 발현 단백질을 신규작용점으로 확정 (식물생장 필수효소) - 목표 유전자를 <i>E. coli</i>로 형질 전환시켜 배양하면서 단백질을 대량 발현 - 발현시킨 단백질을 분리 정제 - 단백질(효소)활성 측정방법 개발 - 효소의 기질 및 중간체를 합성 - 확립된 효소활성 측정방법을 간편화시켜 고속약효검색체제로 전환 - 화합물은행이 보유하고 있는 45,000여 개의 화합물을 대상으로 hit(활성물질)를 발굴 - 발굴된 hit를 대상으로 lead 화합물을 합성
2차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 제초제 타겟 유전자에 대한 분자생물학적 분석 - 신규 제초제 후보 화합물 탐색 및 약효검색(스크리닝) 	<ul style="list-style-type: none"> - 계속적으로 타겟유전자에 대한 탐색을 수행 - 추가되는 효소활성 측정법을 개발하고 이를 고속약효검색체제로 전환 - HIT탐색(화합물은행) 및 유도체 합성을 통하여 선발된 화합물에 대한 온실 스크리닝을 수행하며, 작물에 대한 적용성을 검토 - 살초 스펙트럼 조사 및 용도개발 - 보다 강력한 후보화합물 유도체합성 및 약효검색(온실)
3차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> - 타겟 유전자의 기능 동정 - Target-directed synthesis를 통한 후보 화합물 생산 및 최적화연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 타겟 유전자의 기능 동정 - 후보화합물 약효약해변동요인규명 - 적용 작물에 대한 최적화 연구 - 작용기작 연구 - 인축에 대한 위해성 평가 - 포장시험 적용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 신규 작물보호제 구비조건의 변화

신규 작물보호제 구비조건이 예전에는 농업생산성을 저해하는 해충, 병원균, 잡초를 방제하는 농약의 차원에 있었지만 21세기의 작물보호제 구비조건은 환경 친화성 및 인축에 대한 안전성을 겸비한 작물, 환경, 생태보호용 작물보호제로 변화되고 있다(Fig. 2-1). 따라서 신규 작물보호제 구비조건의 변화에 따른 개발 과정의 변화되어 21세기형 작물보호제를 개발하기 위해서는 인축과 관련이 없는 신규 작용점을 대상으로 기존의 모방적 방법에서 벗어나 창조적인 기능검색 체계와 목적 지향적 합성기술 체계를 구축하고 있다. 세계적으로 손꼽히는 농약회사들은 신규 작용점 탐색을 위해서 다양한 방법과 기술, 막대한 자본을 투자하고 있는데, 특히 post-genome 시대의 정보를 적극적으로 활용하는 분자생물학과 생화학적 접근에 의한 신규작용점 탐색 및 조절물질 개발이 필수적이다. 예를 들어 신젠타 (Syngenta)사에서는 metabolomics를, 노바티스(Novartis)사에서는 antisense기술을 활용하는 등 이외에도 proteomics 등의 기술을 활용하여 다양한 작용점을 탐색하고 있다.

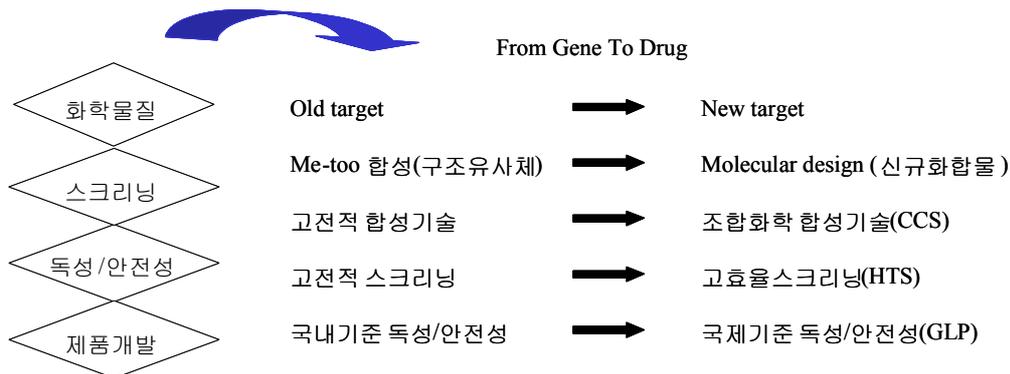


Fig. 2-1. The trend of new agrochemicals developing system.

작용점 발굴 동향

21세기형 작물보호제 개발을 위한 작용점의 선정 및 발굴의 기본적인 원칙은 인체와 관련되지 않는 것이며, 기술적으로는 제초제 작용점 발굴 기술이 살균제 또는 살충제에 비하여 진보되어 있다. 따라서 제초제를 기준으로 정리하면 다음과 같다. 지금까지 개발된 제초제들은 살초증상에 따라 지질생합성 저해제, 생체막 생합성 저해제, 광합성의 제1광계 및 제2광계 전자전달저해제, 산화적 인산화과정 저해제 등과 같이 구조적 파괴형, 아미노산생합성 저해제, 세포분열저해제, 핵산 및 단백질생합성 저해제, 호르몬활성 저해제, IAA transport 저해제 등의 성장 및 결실저해형, 카로틴생합성 저해제 등의 색상변화형으로 구분할 수 있다(Fig. 2-2).

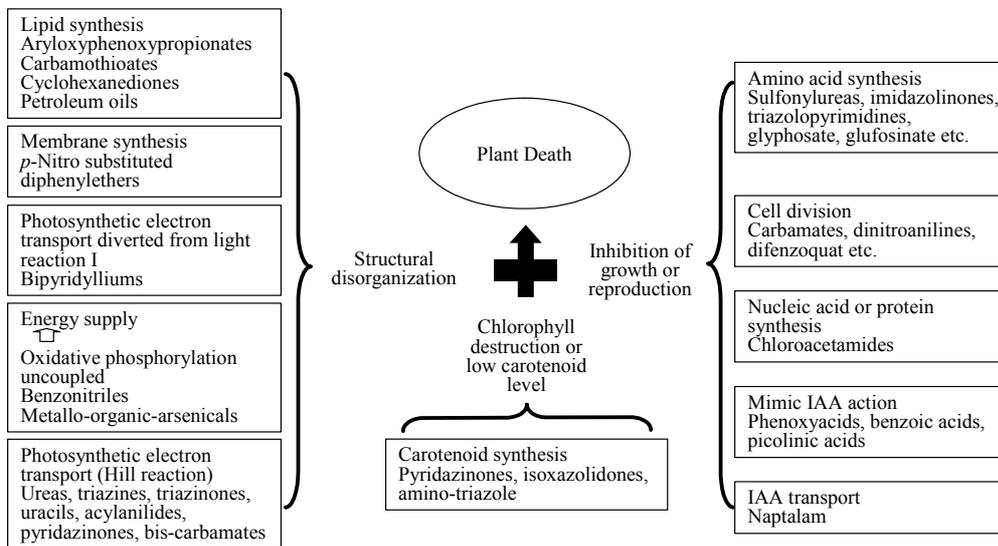


Fig. 2-2. Summary of herbicide mechanism of action.

이와 같이 많은 제초제들 대부분이 me-too 방법으로 합성되고 random 스크리닝으로 선발되었기 때문에 상품으로 개발된 이후에 작용점이 밝혀지게 되었지만 표 2-1에서와 같이 제초제의 작용점은 광합성, 필수아미노산합성과정 등 식물 특이적인 대사과정 관련 효소에 관심이 집중되어 지금까지 개발된 제초제 가운데 광합성 저해제가 20%, 아미노산 생합성 저해제가 17%, 지질생합성 저해제가 13%로 전체의 50%를 차지하고 있다(Table 2-1).

Table 2-1. Metabolic processes affected by herbicides

Metabolic Process	Number of Active Ingredients
Photosynthesis (I and II)	49 (20%)
Amino acid biosynthesis (ALS, EPSPS, GS)	41 (17%)
Lipid biosynthesis (ACCCase, others)	32 (13%)
Cell division	19 (8%)
Tetrapyrrole synthesis	18 (7%)
Auxin function	16 (7%)
Microtubule assembly	13 (5%)
Carotenoid biosynthesis	12 (5%)
Other process	10 (4%)
Unknown	33 (14%)
Total	243

147 herbicides interfere with 11 known SOA (ACCCase, ALS, PSI, PSII, PPO, PDS, HPPD, EPSPS, GS, DHPS, and microtubule).
 63 herbicides affect eight well-described MOA but are of unknown SOA (bleaching, mitosis, cell division, cell wall synthesis, uncoupling, lipid synthesis, auxin function, and auxin transport)
 33 herbicides have an unknown SOA and are not associated with any particular MOA.

Pesticide manual에 기록된 표 2-1의 243개의 제초제 가운데 147개는 11개의 작용점(acetyl CoA carboxylase, acetolactate synthase, photosystem I과 II, protoporphyrinogen oxidase, phytoene desaturase, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, enolpyruvyl shikimate-P synthase, glutamine synthetase, dihydropteroate synthase, microtubules)을 저해하는 것으로 연구되었고, 63개의 제초제는 작용점이 밝혀지지 않았지만 8개의 작용기구(bleaching, mitosis, cell division, cell wall synthesis, uncoupling, lipid synthesis, auxin function, auxin transport)와 관련된 것으로 분류할 수 있다. 그러나 아직까지 나머지 33개 제초제에 대해서는 작용점(site of action)은 물론 작용기구(mode of action)조차 알지 못하고 있다(Saari, Pesticide Chemistry and Bioscience, 2003).

제초제의 개발시기와 작용기작을 종합하면 그림 2-3과 같으며, 1940년대에는 2,4-D를 포함한 옥신활성 제초제가 개발되어 현재까지 사용되고 있으며, 세포분열 저해제들이 뒤를 이어 개발되었고, 광합성저해제, 지질생합성 저해제들로 이어져 1970년대 중반에는 화분과 선택제초제(grammaricide)로서 acetyl CoA-carboxylase 저해제가 개발되었고, 1980년대에는 acetolactate synthase, glutamate synthetase, hydroxyphenylpyruvate dioxygenase 저해제 들이 개발되었다.

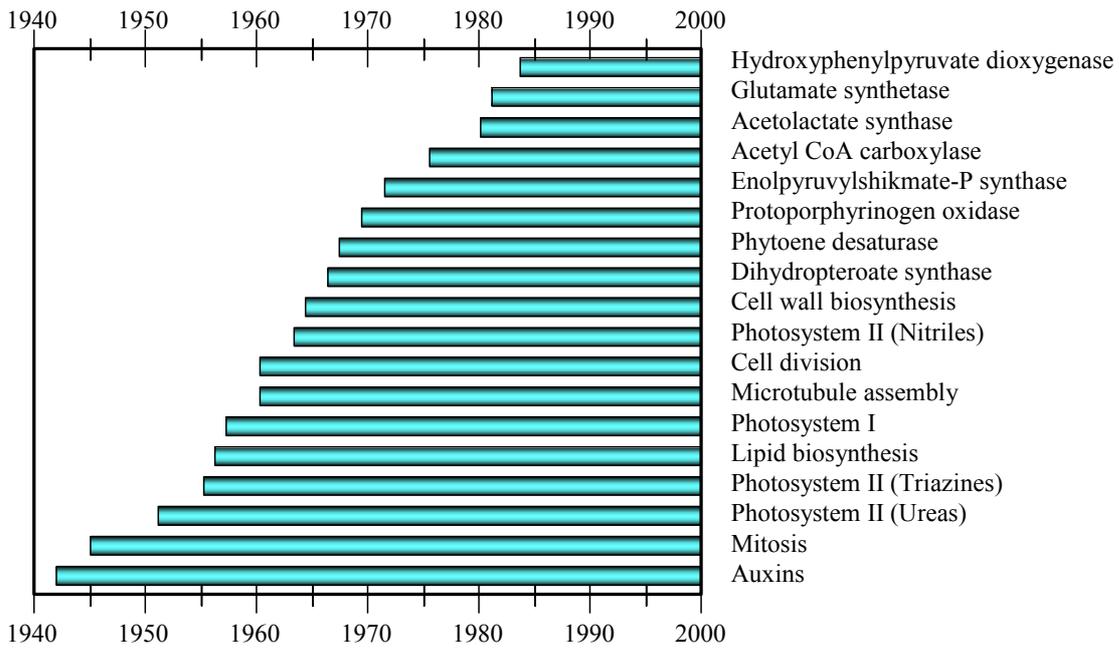


Fig. 2-3. Year of the announcement for herbicides affecting the processes.

1990년대 이후부터는 예전에 개발되었거나 신규한 작용점을 대상으로 제초제들이 개발되고 있다. 신규 작용점으로 대표적인 것은 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, Dihydropteroate synthase 저해제들이며, 앞으로 유망한 작용점으로는 adenylosuccinate synthetase, AMP deaminase, anthranilate synthase, ascorbate peroxidase, asparagine synthetase, auxin transport, cytosolic glutamine sythetase, dihydrodipicolinate synthase, dihydrodipicolinate reductase, carboxypeptidase A, chloroplast NADH dehydrogenase, cinnamyl-alcohol dehydrogenase, geranylgeranyl diphosphate synthase, glutamate dehydrogenase, glutamate synthetase, glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, glutamate synthase, histidine biosynthesis, imidazole glycerol phosphate dehydratase, isopropylmalate dehydrogenase, isopropylmalate isomerase, pheophorbidase, farnesyl transferase, *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase, pyruvateorthophosphate dikinase, threonine dehydratase 등이 있으며 앞으로 더욱 많은 후보 작용점이 밝혀지게 될 것이고 이를 조절하는 물질들이 합성 개발 될 것으로 생각 된다(Abell, et al., 1993; Abell, 1996; Bartley, et al., 1999; Coulter, et al., 1999; Cromartie et al., 1999; Ficarelli, et al., 1999;

Grossmann and Schiffer. 1999; Kishore and Shah, 1988; Kleier and Hsu. 1996; Pillmoor et al., 1995; Rendina and Abell, 1994; Saari, 1999; Schloss and Aulabaugh, 1990; Subramanian, 1997). 지금까지 개발된 제초제를 작용기작 기준으로 대표적인 그룹과 원제를 분류하면 표 2-2와 같다.

Table 2-2. Classification of herbicides with the mode of action

G	Molecular target	Chemical family	Active ingredients
1	Inhibitors of acetyl CoA carboxylase(ACC ase)	Aryloxyphenoxy propionates	clodinafop-propargyl, diclofop-methyl, fenoxaprop- ethyl, fenoxaprop-p-ethyl, fluazifop-p-butyl, fluazifop- butyl, quizalofop-ethyl, quizalofop-p-ethyl
		Cyclohexanediones	clethodim, sethoxydim, tralkoxydim
2	Inhibition of acetolactate synthase (ALS) and also called acetohydroxyacid synthase (AHAS)	Sulfonylureas	bensulfuron, chlorimuron, chlorsulfuron, ethametsulfuron-methyl, halosulfuron-methyl, metsulfuron-methyl, nicosulfuron, primisulfuron, prosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, thifensulfuron-methyl, triasulfuron, tribenuron-methyl, triflusulfuron-methyl
		Imidazolinones	imazamethabenz, imazamox, imazapyr, imazaquin, imazethapyr
		Pyrimidinylthioben zoate	pyrithiobac sodium
		Triazolopyrimidim e	flumetsulam, cloransulam-methyl
3	Microtubule assembly inhibitors	Dinitroanilines	benefin, benfluralin, ethalfluralin, oryzalin, pendimethalin, trifluralin, Pyridazine dithiopyr, thiazopyr
		Benzoic acid	chlorthal-dimethyl (DCPA)
4	Synthetic auxins (action like indoleacetic acid)	Phenoxy carboxylic acids	2,4-D, 2,4-DB, dichlorprop (2,4-DP), MCPA, MCPB, mecoprop (MCP)
		Benzoic acids	dicamba
		Pyridine carboxylic acids	clopyralid, fluroxypyr, picloram, triclopyr, Quinoline
	carboxylic acid	quinclorac	
Inhibition of IAA action	Semicarbazone	diflufenzopyr	
5	Inhibitors of photosynthesis at photosystem II Site A	Triazines	ametryn, atrazine, cyanazine, prometon, prometryn, propazine, simazine
		Triazinones	hexazinone, metribuzin
		Uracils	bromacil, terbacil
		Pyridazinone	pyrazon
Phenylcarbamates	desmedipham, phenmedipham		

6	Similar to group 5, but different binding behavior	Nitriles	bromoxynil, ioxynil
		Benzothiadiazoles	benazon
		Phenylpyridazine	pyridate
G	Target site of action	Chemical family	Active ingredients
7	Inhibitors of photosynthesis at photosystem II Site B	Ureas	diuron, fluometuron, linuron, metobromuron, monolinuron, siduron, tebuthiuron
		Amide	propanil
8	Inhibition of lipid synthesis - not ACCase inhibition	Thiocarbamates	butylate, cycloate, EPTC, molinate, pebulate, thiobencarb, triallate, vernolate
		Benzofuran	bensulide
9	Inhibitors of EPSP synthase	Glycine	glyphosate sulfosate
10	Inhibitors of glutamine synthetase	Phosphinic acids	glufosinate-ammonium
11	Bleaching: Inhibitors of carotenoid biosynthesis (unknown target)	Triazole	amitrole
12	Bleaching: Inhibitors of carotenoid biosynthesis at the phytoene desaturase step (PDS)	Pyridazinone	norflurazon
		Nicotinilide	diflufenican
		Others	fluridone, flurochloridone, flurtamone
13	Bleaching: Inhibition of all diterpenes	Isoxazolidinone	clomazone
14	Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase (PPO)	Diphenylethers	acifluorfen, fomesafen, lactofen, oxyfluorfen
		N-phenylphthalimides	fluthiacet-methyl (thiadiazole), flumiclorac-pentyl
		Oxadiazole	oxadiazon
		Triazolinone	carfentrazone-ethyl, sulfentrazone
15	Inhibition of cell division	Chloroacetamides	acetochlor, alachlor, butachlor, metolachlor, s-metolachlor, pronamide (propyzamid), propachlor demethenamid
		Acetamides	diphenamid, napropamide
		Benzthiozole	mefenacet
16	Unknown	Carbonic acid	ethofumesate
17	Unknown	Organoarsenicals	Arsenic, present as disodium salt of methanearsonic acid (DSMA) Arsenic, present as monosodiumsalt of

			methanearsonic acid(MSMA)
18	Inhibits DHP (dihydropteroate) synthase step	Carbamate	asulam
19	Inhibits indoleacetic acid action	Phthalamate	naptalam
20	Inhibits cell wall synthesis Site A	Nitrile	dichlobenil
21	Inhibits cell wall synthesis Site B	Benzamide	isoxaben
22	Photosystem I electron diverters	Bipyridyliums	diquat, paraquat
23	Inhibitors of mitosis	Carbamates	chlorpropham, propham
24	Uncoupling (ATP) membrane disruptors	Dinitrophenol	dinoseb
25	Unknown	Arylamino propionic acid	flamprop-methyl
26	Inhibition of lipid synthesis - not ACCase inhibition	Chloroacetic acid	trichloroacetic acid (TCA)
27	Unknown	Cineole	bromobutide, cinmethylin, dymron, flupoxam
28	Bleaching inhibition of 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase (4-HPPD)	Isoxazole	isoxaflutole
		Pyrazole	pyrazolynate
		Triketone	sulcotrione

* WSSA classification

그러나 작용기작을 대상으로 하여 신규 제초제를 합성 개발할 수는 없고, 효소/수용체 수준에서의 작용점이 개발되어야 새로운 구조의 화합물을 설계하고, 합성하면서 신규 제초제를 개발할 수 있는 것이다. 따라서 지금까지 개발된 제초제들의 작용점이 효소/수용체 수준에서의 작용점은 Acetyl CoA carboxylase(ACCase), Acetolactate synthase(ALS), Protoporphyrinogen oxidase(PPO), Phytoene desaturase step(PDS), 4-hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase(4-HPPD), EPSP synthase, Glutamine synthetase(GS), Dihydropteroate synthase(DHPS) 등과 같은 8개에 불과하며 이들을 대상으로 개발된 제초제의 그룹과 2005년 매출예상액을 그림 2-4에 나타내었다.

신규 제조 제 개발	Target site	Representative group	Sales
		Acetyl CoA carboxylase (ACCase) 950 \$m (6.6%)	Aryloxyphenoxypropionates Cyclohexanediones
	Acetolactate synthase (ALS) 2,250 \$m (15.7%)	Sulfonylureas Imidazolinones Triazolopyrimidines Pyrimidinyl(thio)benzoates	1,173 \$m 543 \$m 299 \$m 235 \$m
	Protoporphyrinogen oxidase (PPO) 1,202 \$m (8.4%)	Diphenylethers Phenylpyrazoles N-phenylphthalimides Thiadiazoles Oxadiazoles Triazolinones Oxazolidinediones Pyrimidindiones Others	547 \$m 120 \$m 80 \$m 123 \$m 99 \$m 198 \$m 25 \$m 10 \$m
	Phytoene desaturase step (PDS) 250 \$m (1.7%)	Pyridazinones Pyridinecarboxamides Others	240 \$m 5 \$m 5 \$m
	4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase(4-HPPD) 37 \$m (0.3%)	Triketones Isoxazoles Pyrazoles Others	12 \$m 10 \$m 5 \$m 10 \$m
	EPSP synthase 4,532 \$m (21.6%)	Glycines	4,532 \$m
	Glutamine synthetase (GS) 50 \$m (0.3%)	Phosphinic acids	50 \$m
	Dihydropteroate synthase (DHPS) 10 \$m(0.1%)	Carbamates	10 \$m

* 2005/Herbicide 14,340 \$m/Total 29,695 \$m, Wood Mac.
* 작용점 8개 매출 총액 92.9억\$/Y, 작용점 1개당 13.4억\$/Y의 시장성 보유

Fig. 2-4. Putative sales of target site according to the representative group.

제조작용점의 상업적 impact를 직접적으로 계산할 수 없지만, 지금까지 개발된 제조제 시장을 8개의 작용점별 시장(ACCCase, 9.5억\$/Y; ALS, 22.5억\$/Y; PPO, 12억\$/Y; PDS, 2.5억\$/Y; 4-HPPD, 0.5억\$/Y; EPSP, 45.3억\$/Y; GS, 0.5억\$/Y; DHPS, 0.1억\$/Y) 총액 92.9억\$/Y을 작용점 1개 당 시장으로 평균계산하면 11.6억\$/Y의 시장성을 가지고 있다. 세계 농약시장의 성장률은 3~5%/Y이지만 시작 단계에 있는 신규 작용점에 대한 수요가 높기 때문에 실질적인 성장률은 10%이상으로 예상된다. 특히 동물에 존재하지 않는 식물 특유의 효소를 작용점으로 하기 때문에 인체와 환경에 무해한 제조제를 개발할 수 있으며, 유용유전자의 지적 소유권을 확보하여 다양한 구조의 신규 제조제 개발 독점권을 행사할 수 있다.

제 2절 신규 작용점 발굴 방향

이미 알려진 작용점을 대상으로 새로운 제초제를 개발하고자 할 경우 신제품이 개발될 시점이면 선행 제품에 의한 저항성 잡초가 발생되거나(Fig. 2-5), 상권이 독점되어 새로운 시장개척이 어렵고, 인체와 환경에 대한 국민들의 관심이 높아져서 인체와 환경에 영향을 주지 않으면서도 대상 식물에는 치명적으로 작용하는 신규 작용점의 탐색이 신규 제초제의 개발에 제한 요인이 되어왔던 것이다 (Pillmoor et al., 1995; Saari, 1999).

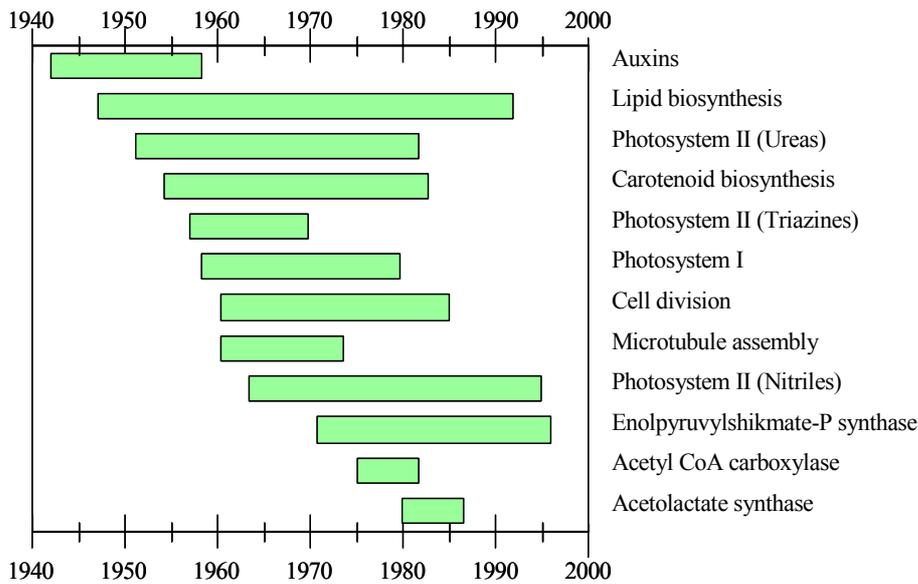


Fig. 2-5. Time of herbicide introduction (left edge of bar) and appearance of resistance (right edge of bar).

식물 특이적 필수대사 저해제 개발을 위한 신규 작용점 발굴대상으로는 식물체가 보유하고 있는 유전자를 공략하는 것이다. 즉, 식물이 보유하고 있는 약 50,000여 개의 유전자 가운데 신규 제초제의 작용점으로 활용할 수 있는 유전자가 0.1% 존재한다면 50개, 1%일 경우 500개, 10%일 경우 5,000개의 신규 작용점

이 새롭게 탐색될 수 있을 것이다(Saari, 1999). 따라서 유전자 분석이 모두 끝난 애기장대풀(*Arabidopsis thaliana*, The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)을 대상으로 신규 제초제 개발을 위한 작용점 탐색 분야에 기능성 유전체 연구가 접목되고 있다.

유전자 발굴을 통한 신규 작용점 탐색

신규 작용점을 탐색하는 유전공학적 방법으로서 식물 기능성 유전체 연구는 1) 식물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 제한하여 신 기능성 형질 전환 식물을 창제하거나, 2) 이 기술을 대량으로 적용하여 원하는 형질의 식물체를 선 발하거나, 3) 식물 유전자들의 식물체내 기능을 대량 확인하는 데 이용되는 유전자 기능 확인 및 유용 유전자를 발굴하는 연구로 분류할 수 있다. 미국에서는 이미 "The 2010 Project"를 통하여 유전자 기능연구를 적극적으로 추진하고 있다 (Chory, 2000). 유전자의 분리와 그 기능을 확인하는 효과적인 방법 중의 하나인 cDNA sequencing과 기존의 mutagenesis 방법이 활용되고 있는데, T-DNA insertional mutagenesis 방법의 경우 식물체내 유전자의 중복성 때문에 실제 유전자의 기능을 확인하는 데 한계가 있다. 이들이 가지는 한계를 극복하면서 새로운 유용 유전자를 확인, 분리할 수 있는 신기술로 식물체내 유전자를 무작위로 파괴시킨 변이체를 대량 생산하고 그 기능을 확인하는 random antisense mutagenesis(RAM, Fig. 2-6) 기술을 세계 최초로 포항공대와 (주)제노마인에서 개발하여 활용하고 있다. RAM approach는 식물에 들어가서 antisense로 발현되게 한 antisense cDNA library를 이용하여 transgenic plant의 pool을 만들고 이들 pool에서 돌연변이를 발견한 후 이에 해당하는 cDNA를 간단한 PCR에 의해 분리하는 것을 원리로 하며 다음의 특징을 가진다.

- a) 변이체 표현형의 우성으로 발생 초기에 쉽게 변이체를 동정할 수 있다.
cf. insertional mutagenesis는 변이체의 표현형이 열성으로 나타난다.
- b) Multigene family에서 *in vivo*상태로 유전자 기능을 동정할 수 있다.
- c) 필수 유전자의 기능성 동정에 보다 적합하다.
- d) 필수 유전자의 antisense disruption은 변이체가 회복할 수 없는 치사를 이끌 것이다. 그러므로 inducible vector의 사용이 필수적이다.
- e) Simple PCR method를 통하여 쉽게 유전자를 clone할 수 있다.

기능을 유용하게 활용할 수 있는 유전체 연구가 진행되지 않았던 과거에는 이러한 분야의 연구가 불가능하였지만, 수많은 유전자 정보가 제공될 미래에는 유전자의 기능을 파악하고 조절하는 분야가 어떠한 분야보다 활발하게 추진될 것이다. 따라서 앞으로는 식물체에만 존재하면서 환경 친화적인 신규 식물기능 조절물질과 제초제만이 세계적인 시장을 확보 할 수 있으며 이는 시간을 다투는 중요한 연구인 것이다. 특히 antisense approach 기법을 이용한 신규작용점 탐색 방법은 유전자 기능을 기초로 출발하는 목표 지향적 접근방식이기 때문에 그 동안의 모방적 창출에서 독창적 신규 식물기능 조절물질 개발의 신기원이 될 것으로 확신 한다(Tang and Sturm, 1999; Zou et al., 1999; D'Aoust et al., 1999; Bourque, 1995).

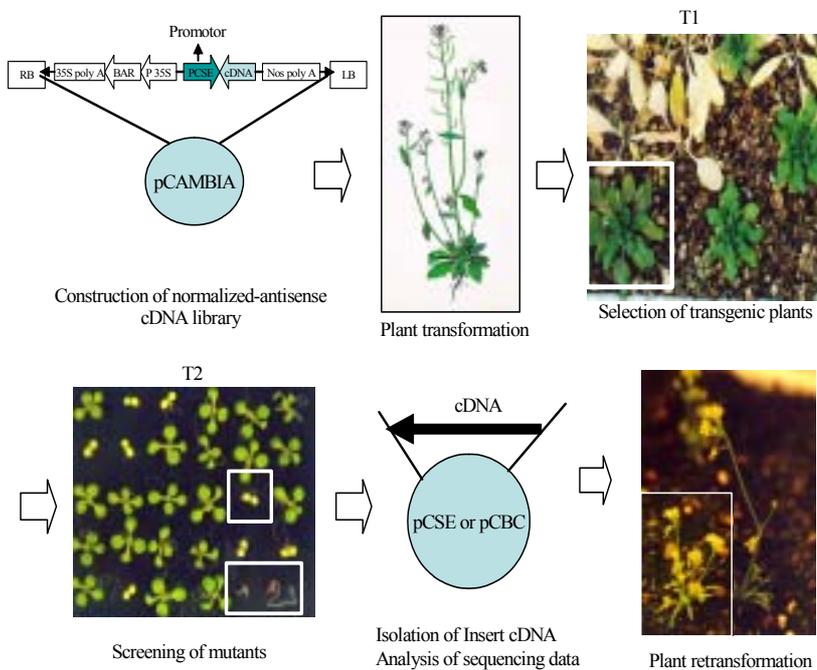


Fig. 2-6. Principle of RAM (random antisense mutagenesis) approach in *Arabidopsis*.

신규 작용점을 탐색하는 유전공학적 방법으로서 다른 하나는 신규 작용점으로 유망한 것들을 대상으로 접근하는 방법이다. 아무리 많은 후보 작용점이 존재한다 하여도 작용점이 결핍된 식물체가 성장을 하지 못하거나 죽지 않는다면 제

초체로서의 작용점이 될 수 없다(Abell, 1993, 1996; Höfgen. R. 1994, 1995, 1998; 황 등, 2000). 이를 확인하기 위해서는 작용점/효소를 저해하는 것으로 이미 알려진 화학물질을 처리하여 확인할 수 있으나 식물체내에서 화학물질이 변화되거나 작용점까지 도달하지 못하는 경우에는 확인할 수가 없다. 이를 해결하기 위해서는 유망 후보작용점의 유전자 분석을 통하여 확인된 유전자를 antisense기법으로 형질전환 시킨 식물체를 만들었을 때 식물체가 나타내는 결과를 통하여 작용점을 탐색하는 것이다(Fig. 2-7).

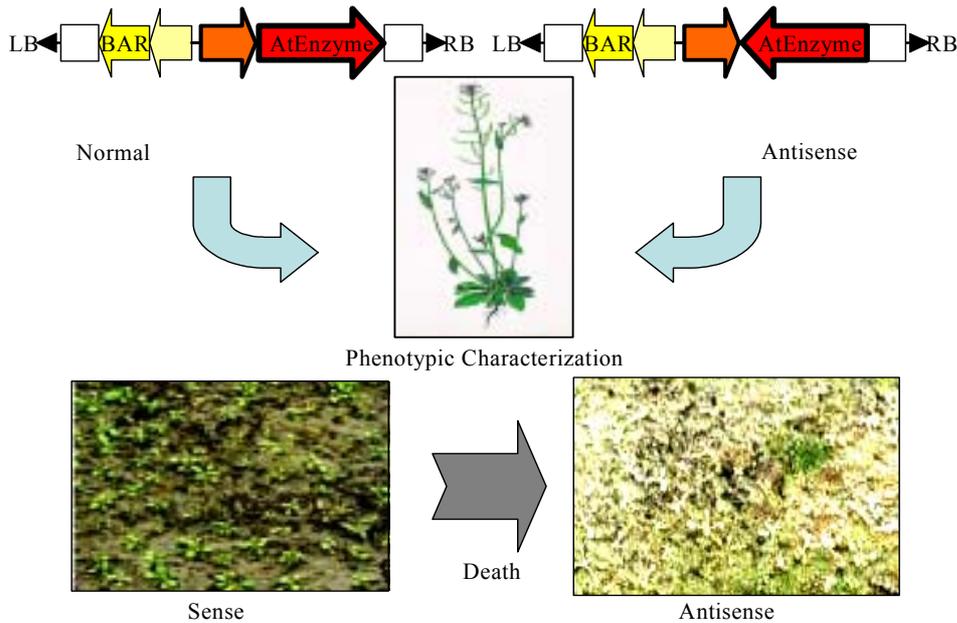


Fig. 2-7. Phenotypic characterization for transgenic plants with sense and anti-sense expression of target gene in *Arabidopsis*.

즉, 정상적인 식물체의 필수 유전자의 일부를 역방향으로 삽입시켰을 경우 식물체가 죽게 된다면 동일 유전자가 발현하는 단백질/효소의 기능을 억제하는 화학물질을 제초제로 개발하여 처리한다면 필수 유전자 발현 단백질이 만들어지지 않기 때문에 식물체는 반드시 죽게 될 것이다. 특히 제초제 분야에서는 Novartis가 제초제의 target 유전자의 발굴에 이 기술을 적용하고 있으며 이와 관련된 분야에서 수 년 내에 수 십 종의 antisense 이용 상품을 시장에 내려하고 있다(<http://www.bio.org/food&ag/foodwelcome.html>, Genetic Engineering News 1997). 이러한 기술을 활용하여 국내에서도 신규 제초제 작용점으로 7-keto-8-aminopelagonic

acid(KAPAS, 특허출원번호 2002-0038011, PCT/KR 2003/001301)과 cinnamyl alcohol dehydrogenase(특허출원번호 2004-0013086) 등이 개발되었다.

합성 및 스크리닝 기술의 변화

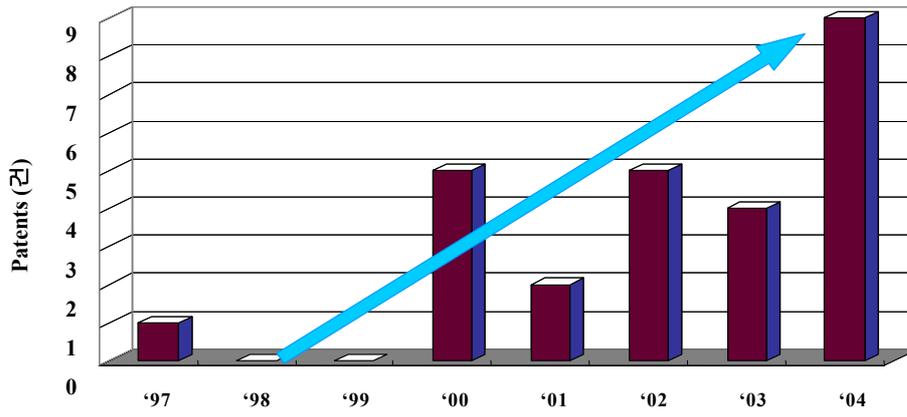
새로운 작물보호제를 개발하기 위한 스크리닝 방법은 기존의 활성물질이나 천연물질을 새로운 물질합성의 선도물질로 이용하는 Me-too합성과 이들에 대한 무작위 스크리닝(random screening), 주요 대사과정에 대한 특정 저해제의 생합리적 설계(Bio-Rational design) 등 이었다(松中, 2000; Schloss and Aulabaugh, 1990; Saari, 1999; Rendina et. al. 1994). 그러나 현대적 스크리닝 기술은 기존방법에 근본적인 틀을 둔 채로, 초기 검색 단계에서 다양한 신규 작용점(효소/수용체)을 대상으로 96 또는 264-well을 이용하여 대량의 화합물을 검색하는 **고효율 검색방법**(high throughput screening, HTS)으로 전환되고 있다. 합성기술도 **조합화학**(combinatorial chemical synthesis, CCS)기술이 접목되어 이론적으로 10^{30} ~ 10^{50} 개가 존재할 수 있는 화합물 합성이 기존의 방법에 비해 수십 배 또는 수백 배 빠른 속도로 진행되고 있고(Broach and Thorner, 1976; 畑中, 2000; Hess et al. 2001) 화합물 은행이 등장하여 수십만 개의 화합물을 활용할 수 있게 되었다.

제 3절 신규 작용점에 대한 특허분석

신규 작용점에 대한 특허를 분석하기 위하여 검색식을 (herbicide or insecticide or fungicide*) and target으로 PCT 검색결과 66건이 발견되었다. 이들 중에서 중복을 배제시키고 나면 28건으로 요약된다. 이들을 출원년도별로 정리하면 그림 2-8와 같다. 즉, 2000년 이전에는 거의 없지만 이후 출원되기 시작하여 2004년까지 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이를 국가별로 분석하면 미국이 전체의 66%를 점유하고 있고, 영국(16%), 독일(11%)에 이어서 한국(7%)이 차지하고 있음을 확인하였다(Fig. 2-9). 한국이 차지하고 있는 것은 본 연구사업에서 출원한 특허 들이었다(Fig. 2-10).

향후 연구개발방향 요약문

21세기형 작물보호제를 개발하기 위해서는 인축과 관련이 없는 신규 작용점을 대상으로 하는 **창조적인 기능검색 체계와 목적 지향적 합성기술 체계**를 구축하여야 할 것이다. 왜냐하면 신규 작물보호제 개발에 있어서 환경 친화성과 인축 안전성을 우선적으로 요구하기 때문이다. 그러나 우리가 개발할 수 있는 신규



특히 출원 년도 별 분석
 작용점은 한정되어 있으며, 세계적으로 손꼽히는 작물보호제 개발회사들이 신규

Fig. 2-8. Annual analysis of patents for pesticide.

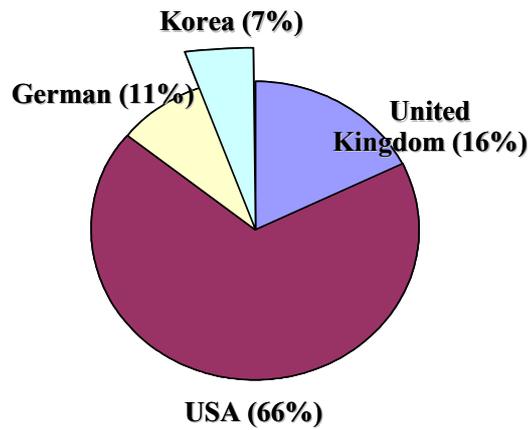


Fig. 2-9. National analysis of patents for pesticide.

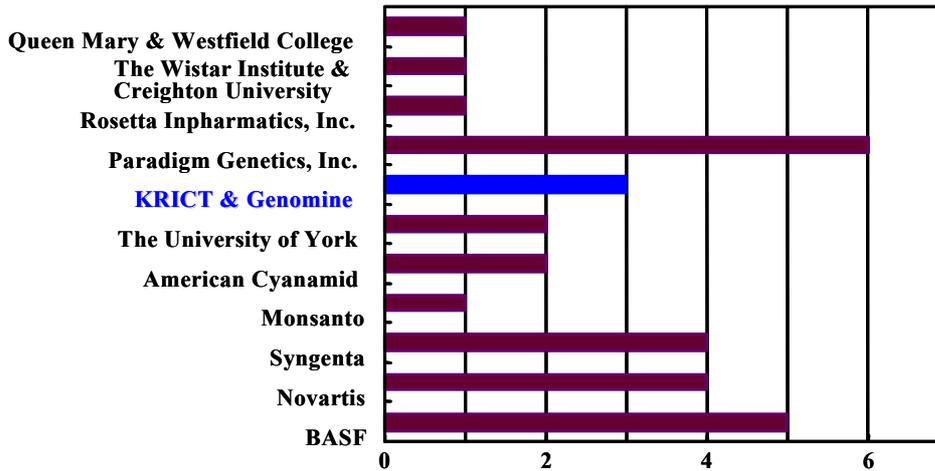


Fig. 2-10. Analysis of patents for pesticide according to application company.

작용점탐색을 위해 다양한 방법과 기술, 막대한 자본을 투자하고 있다. 이는 신규 작용점의 개발이 21세기형 신규 작물보호제 개발을 위한 핵심임을 증명하는 것이기 때문에 시간을 다투어 진행되어야 할 분야임이 틀림없다. 선진국의 작물보호제 개발기업과 모든 분야에서 경쟁할 수 없지만, 과거 20여 년 동안의 노력으로 신규 작물보호제 개발을 위한 기반기술이 축적되어 대부분 선진국 수준에 도달하였다. 특히 유전자의 분리와 그 기능을 확인하는 antisense 기법은 세계적으로 앞서가는 첨단기술이며, 이를 이용한 연구결과는 이미 세계적으로 특허를 출원하였기 때문에 신규 제초제가 개발된다면 개발된 제초제의 독점 사용권은 물론 이를 이용한 저항성 품종개발, 응용 분야 확대적용 등을 통하여 세계적인 제초제의 시장진입과 함께 Round-up ready에 이어 제 2의 제초제 저항성 작물을 출시할 수 있는 기틀이 될 수 있을 것이다. 또한 전통적인 유기합성기술과 조합화학(CCS), 고효율대량검정방법(HTS)이 부분적으로 추진되고 있으며, 화합물은행이 구축 실행되고 있다는 점을 감안하면 단 기간 내에 선진 7개국을 catch up 할 수 있게 될 것이다. 독성/안전성 분야에서도 국제적인 GLP수준으로 인정받고 있으며, 온실 및 포장시험기술은 물론 신규 작물보호제 개발경험을 가진 기업들이 참여하기 때문에 어떤 타 분야보다 성공가능성은 높다고 판단된다.

제 3장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 신규 작용점 후보 선발

1. 서론

신규 제초제의 개발에 제한 요인이 되어왔던 것은 인체와 환경에 영향을 주지 않으면서도 대상 식물에는 치명적으로 작용하는 신규 작용점의 탐색이었다. 이와 같은 작용점 탐색을 위해서 그 동안 광합성과 필수아미노산합성과정 등 식물 특이적인 대사과정 관련 효소에 관심이 집중되어 왔다. 사람과 동물은 광합성과 필수아미노산합성 기능이 없기 때문에 이를 저해하는 화학물질들은 인체에 미치는 독성이 없거나 낮을 것으로 예상하기 때문이다. 예상대로 지금까지 개발된 이들의 경구독성(LD₅₀)은 4,000-5,000 mg/kg으로 우리생활에서 찾아볼 수 있는 술(4,500 mg/kg)과 비슷하다. 지금까지 개발된 제초제 243개 중 147개의 제초제가 11개의 작용점(acetyl CoA carboxylase, ACCase; acetolactate synthase, ALS; photosystem I, PSI; photosystem II, PSII; protoporphyrinogen oxidase, PPO; phytoene desaturase, PDS; 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, 4-HPPD; enolpyruvylshikimate-P synthase, EPSPS; glutamine synthetase, GS; dihydropteroate synthase, DHPS; microtubules)을 저해하는 것으로 밝혀졌으며, 63개의 제초제는 작용점이 밝혀지지 않았지만 8개의 작용기구(bleaching, mitosis, cell division, cell wall synthesis, uncoupling, lipid synthesis, auxin function, auxin transport)와 관련된 것으로 분류할 수 있고, 나머지 33개의 제초제는 작용점(site of action)은 물론 작용기구(mode of action)조차 알지 못하고 있다. 따라서 아직까지 작용점이 밝혀지지 않은 99개 제초제의 작용점을 구명하게 되면 신규 제초제를 개발하는 작용점으로 활용할 수 있을 것이다. 또한 식물체가 보유하고 약 50,000여 개의 유전자 가운데 신규 제초제의 작용점으로 활용할 수 있는 유전자의 확률이 적게는 0.1%의 50개, 많게는 10%의 5,000개의 신규 작용점이 새롭게 탐색될 수 있을 것이다. 따라서 전 세계적으로 유전체 연구가 급속도로 진행되고 있고 *Arabidopsis thaliana*의 유전자 분석이 모두 끝났기 때문에 최근에는 신규 제초제 개발을 위한 작용점 탐색 분야에 기능성 유전체 연구가 접목되고 있다.

2. 신규작용점 후보 도출

신규 작용점 후보를 도출하는 방법은 크게 2가지로 분류할 수 있다. 첫째는 표

적 효소 변이 유전자 형질전환을 통한 표현형 확인, 둘째는 돌연변이 생태형으로부터 치사관련 표적효소선발 확정 방법이 있다(Fig. 3-1-1).

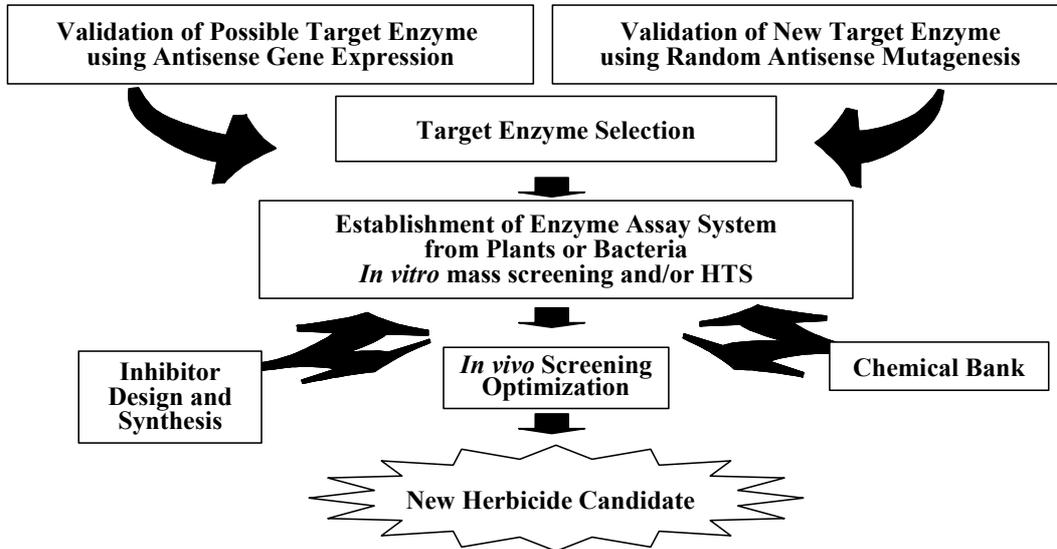


Fig. 3-1-1. From target to candidate

가. 표적 효소 변이 유전자 형질전환을 통한 표현형 확인

신규 제초제 작용점/효소를 선정하기 위하여 120개의 식물 특이적 효소를 대상으로 가능성을 분석하여 대표적인 효소들을 선별하였다. 식물 특이적 효소는 Plant Biochemistry, Herbicide and Plant Physiology, Herbicide Action, Physiology of the Herbicide Action, Data for Biochemical Research, Handbook of enzyme inhibitors, An Introduction to Metabolic Pathways, Crop safeners for herbicides, Herbicides, Weed Science 등을 대상으로 조사하였다. 식물 특이적 효소 들 중에서 신규 제초제의 작용점으로서 가능성과 특허 소유여부를 파악한 결과 최종적으로 13개의 효소 adenylosuccinate synthase, AMP deaminase, antranilate synthase cinnamyl alcohol dehydrogenase, dethiobiotin synthase, dihydrodipicolinate reductase, dihydrodipicolinate synthase, farnesyl pyrophosphate, farnesyltransferase, geranylgeranyl diphosphate synthase, glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, pheophorbidase, imidazoleglycerol phosphate dehydratase 등으로 압축하였다(Table 3-1-1, 3-1-2).

Table 3-1-1. Analysis of the information for target candidates

Target candidates	Patent analysis
1. Adenylosuccinate synthetase	·Patents of target for herbicide
2. AMP deaminase	·Patents of target for herbicide
3. Dethiobiotin synthetase	·No patents
4. Dihydrodipicolinate synthase	·Patents of target for herbicide
5. Dihydrodipicolinate reductase	·Patents of target for herbicide
6. Farnesyl pyrophosphate synthase	·Patents of target for herbicide
7. Geranylgeranyl diphosphate synthase	·Patent for taxol
8. Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	·No patents, Many papers
9. Farnesyltransferase	·Patent for drought
10. Imidazoleglycerolphosphate dehydratase	·No patents
11. Anthranilate synthase (EC 4.1.3.27)	·Patents of target for herbicide
12. Pheophorbidase	·No patents, Many papers
13. Cinnamyl alcohol dehydrogenase	·Patents for lignin biosynthesis

이들 중 식물체 필수효소를 1차 제조제 target으로 삼아 그들의 유전정보를 BLAST, TAIR 등의 *Arabidopsis* D/B를 통하여 분석하고, 또한 상업적 가치를 판단하기 위하여 그들에 대한 지적소유권을 조사하였다(Fig. 3-1-3, Table 3-1-1). 식물체 필수 효소에 대한 정보 분석 결과, 본 연구팀은 동물체에는 존재하지 않으며 단일 대사 경로를 가지는 biotin pathway 및 lignin 생합성에 관여하는 효소에 대하여 중점적으로 정보 분석을 수행하였다. 이러한 연구는 환경친화적인 제조제의 개발에 대한 가능성을 제공할 수 있음을 제시한다. 즉, biotin 생합성 및 lignin 생합성 경로는 식물의 성장에는 필수적이며, 동물 및 인간에게는 존재하지 않기 때문에, biotin 혹은 lignin 생합성을 저해한다면, 동물이나 인간에게는 영향을 미치지 않으면서, 유해한 식물의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 가능성이 크다고 할 수 있을 것이다. 본 연구팀은 biotin pathway에 관여하는 효소들 중 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase(KAPAS)와 dethiobiotin synthetase(DTBS)를 신규 작용점으로 선정하여 일차년도엔 biotin 생합성 경로의 첫 번째 단계인 L-alanine과 pimeloyl CoA을 KAPA로 탈카르복실화 응축(decarboxylative condensation) 반응에 관여하는 KAPAS에 관하여 집중적으로 연구를 수행하고자 하였다.

Table 3-1-2. Information of new target for new herbicide development

Possible enzyme	Information
Adenylosuccinate synthetase	Hydantocidin, blocked the two-step conversion of IMP to AMP in the <i>de novo</i> purine biosynthesis pathway. Adenylosuccinate synthetase as a herbicide target of commercial potential
Anthranilate synthase	6-methyl anthranilate, traversing the tryptophan biosynthetic sequence, exhibits noncommercial levels of herbicidal activity. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death. phenylalanine ammonia-lyase(PAL), glutathione S-transferase(GST) and anthranilate synthase(ASA1), an enzyme of phytoalexin biosynthesis
Farnesyl pyrophosphate synthase	Farnesyl pyrophosphate synthase in the prenylbi- synthetic pathway and that this enzyme represents a new target site for the development of herbicides.
Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (GSAT, E.C.5.4.3.8)	Vitamin B ₆ -dependent enzyme that catalyzes the amino group transfer of glutamate 1-semialdehyde(GSA) to form 5-aminolevulinic acid (ALA). It is the final enzyme of the C5 pathway converting glutamate into ALA in higher plants, algae and many bacteria. Eight molecules of ALA are required to form tetrapyrroles, e.g. chlorophyll or heme, Genes for GSAT have been identified in bacteria as well as in higher plants e.g. barley and soybean. The enzyme is completely inactivated by substitution of Lys ₂₇₂ with alanine. catalyzing a reaction step in chlorophyll biosynthesis, plants with chlorophyll contents less than c. 25% of that in the wild type died, the symptoms partially resembled the effects of bleaching and photodynamic herbicides. GSAT reduced antisense plants indicate that the inhibition of GSAT enzyme activity in plants by about 75% would result in plant death and the GSAT might be a valid target for biochemical design of herbicides.
Pheophorbidase	Pheophorbidase catalyzes <i>in vitro</i> hydrolysis of the methylester linkage in the C-13-carbomethoxyl group of pheophorbide a (Phed) to yield C-13-carboxy pyropheophorbide a (carboxylpyrophed) and methanol. CarboxylPyrophed was converted to pyropheophorbide a (Pyrophed) by a non-enzymatic decarboxylation reaction depending on the concentration of acetone in the reaction mixture. The enzyme activity was found in several other higher plants as well as <i>Chenopodium album</i> . Kenji Watanabe et al.(1999) named this enzyme "Pheophorbidase" and characterized its enzymatic properties to some extent.
3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase (HMGR)	The corresponding antisense constructs decreased general isoprenoid levels
Adenosine-5'-phosphate deaminase(AMP deaminase) (EC 3.5.4.6)	Following phosphorylation at the 5' hydroxyl on the carbocyclic ring <i>in vivo</i> . inhibition of AMP deaminase leads to the death of the plant through perturbation of the intracellular ATP pool.

Continued 1

Aspartate kinase (AK, EC 2.7.2.4)	Genetical analysis of this unique double aspartate kinase mutant indicated that both mutations were located on chromosome 2, but their loci(ak1 and ak2) were found to be unlinked. Aspartate kinase(AK) that are subject to feedback inhibition by the end-product amino acids lysine or threonine. Calcium chelating agent, EGTA or calcium channel blocker, verapamil inhibit the red light effect confirming the involvement of calcium in the phytochrome induced aspartate kinase activity.
Chlorophyllase (EC 3.1.1.14)	Catalyzes the hydrolysis of ester linkage between chlorophyllide and phytol, is the only purified enzyme in the degradation pathway of Chls.
Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD; EC 1.1.1.195)	Catalyses the last step in the biosynthesis of the lignin monomers. The down-regulation of the CAD enzyme was associated with a red coloration of the stem. Modulation of enzymes involved in lignin biosynthesis
Dethiobiotin synthetase	The penultimate enzyme in the biosynthesis of the essential vitamin biotin. A new potential target for novel herbicides
Dihydrodipicolinate reductase(DHDPR) (EC 1.3.1.26)	Have attracted much recent attention as potential herbicide targets. Dipicolinic acid was a reversible competitive inhibitor of DHDPR with respect to the substrate (4S)-4-hydroxy-2,3,4,5- tetrahydro-(2S)-dipicolinic acid, as was isophthalic acid. These compounds represent possible leads in the development of novel herbicides.
Dihydrodipicolinate synthase(DHDPS) (EC 4.2.1.52)	Have attracted much recent attention as potential herbicide targets. DHDPS was feedback-inhibited by Q-lysine; inhibition was reversible and uncompetitive with respect to both (S)-ASA and pyruvate.
Glutamate synthase	The assimilatory enzymes glutamine synthetase and glutamate synthase catalyze reactions that convert α -ketoglutarate and ammonia to glutamate, which is then used in a wide variety of biosynthetic reactions. Glutamate synthase (GOGAT) is a key enzyme in the assimilation of inorganic nitrogen in photosynthetic organisms.
Phytoene synthase	Carotenoid biosynthetic enzyme. A possible regulatory role in color formation during chromoplast (flower) development.
Phytoene synthase-2	Both GGPP formation and phytoene desaturation were elevated in these mutants.
S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)	Antisense plants display abnormal phenotypes. SAMDC is a key enzyme involved in the biosynthesis of the polyamines spermidine and spermine and is also known to influence the rate of biosynthesis of ethylene. Antisense transgenic plants showed a range of stunted phenotypes with highly branched stems, short internodes, small leaves and inhibited root growth. Overexpression of the engineered SAMDC is lethal to the plants.

나. 돌연변이 생태형으로부터 치사관련 표적효소선발

RAM approach를 통하여 확보된 변이체들을 다음의 분류 체계를 통하여 분류하였다. 1) 색소관련 변이체: white cotyledon and leaf, yellow cotyledon and leaf, yellow-green cotyledon and leaf, pale green cotyledon and leaf, dark green cotyledon, 2) 생리관련 변이체: 생장 억제, 잎의 분화 및 생장 억제, 발아 및 잎 발달 단계에서의 치사, 굴광성/굴지성 파괴, 3) 형태관련 변이체: no true leaf, 잎 형태이상, long hypocotyl, 기타 등. 이러한 분류 체계 중 치사관련 변이체는 생리관련 변이체 중 발아 및 잎 발달 단계에서의 치사, 색소관련 변이체중 white cotyledon and leaf, yellow cotyledon and leaf에서 중점적으로 선별되었다(Fig. 3-1-2). 상기의 분류 체계에서 치사관련 변이체를 선별하여 변이체의 유전정보를 분석하였다(Table 3-1-3). 이때 antisense effect를 가지는 변이체는 삽입된 cDNA를 분석하여 유전자 정보를 얻었으며, insertion effect를 가지는 변이체는 flanking DNA를 분석하여 유전자 정보를 확보하였으며, 이는 치사관련 변이체로부터 유전자의 분석을 통하여 확보된 17종의 제초제 타겟 유전자에 대한 정보이다. 이 중 10종은 antisense effect를 가지며 7종은 insertion effect를 가진다. 본 유전자 정보 중 CAD(cinnamyl alcohol dehydrogenase)는 앞서 "A" section의 D/B를 통한 신규 작용점 발굴에서도 선별되었다. 따라서 본 연구팀은 상기 제초제 타겟 유전자 중 lignin 생합성 경로에 관여하는 효소들 중 경로의 하위 단계에 존재하는 CAD는 본 연구 수행 2번째 방법인 기능성 유전체 연구를 통한 연구에서도 제초제 타겟으로 선정하여 지속적인 연구를 수행하였다.

Table 3-1-3. Candidates for potential herbicide target gene in the RAM pool

Line	Phenotype (mutant:WT)	cDNA inserts	비 고
		Flanking DNA	
GIR102420	lethal at leaf dev. (07:22)	PSI subunit II precursor, No:AJ245906	insertion effect
		putative protein (No: CAB62006, promoter region insertion)	
GIR103157	no true leaf (09:21)	A.t ats1B, ats2B and ats3B gene for rbcS	insertion effect
		RNA-binding protein-like (MNB8.12)	

Continued 1

GIR106143	white, almost no true leaf (11:17)	hypothetical protein contains zinc- finger motif, No: F24J8.17	insertion effect
GIR106165	lethal (9), pale (4), dark (5) (18:11)	photosystem II protein X precursor (At2g06520)	antisense effect
GIR110079	lethal at germ. (06:24)	Ribosomal protein S28-like (F8F6_60), No: CAB85505 <i>Arabidopsis thaliana</i> Argonaute (AGO1)-like protein (At2g27880), No: NM128347	insertion effect
GIR110801	T1 phenotype, growth inhibition some seed	unknown protein (At2g33460), No: AAB80663	antisense effect
GIR110802	T1 phenotype, bushy, dwarfism, little silique	Chl a-b binding protein 4 precursor homolog (AT3g47470), No: AF325012	antisense effect
GIR110808	T1 phenotype, 빠른 노화, 잎수 부족, some flowering	unknown protein (AT5g06230) No: AF361591	antisense effect
GIR110809	T1 phenotype, severe growth inhibition, dark green, lethal-like	cinnamylalcohol dehydrogenase-like protein	antisense effect
GIR110812	T1 phenotype, 빠른 노화, 잎수 부족, some flowering	E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative (At3g52560), No: NM_115116	antisense effect
GIR110818	T1 phenotype, growth inhibition	polyubiquitin UBQ10 (At4g05320) No: AY139999	antisense effect
GIR110820	T1 phenotype, severe GI, little flowering	mitogen-activated protein kinase 3 (F9K21.220), No: AF386961	antisense effect
GIR110846	T1 phenotype, growth inhibition	putative alanine aminotransferase (At1g23310), No: AF360195	antisense effect
GIR210049	lethal at germ, (09:21)	putative chloroplast protein CP12 (At2g47400), No: AY062839 putative bHLH protein (At2g31220), No: BT005711	insertion effect
RAM-dwarfl	T1 phenotype, dwarfism, bushy	acyl CoA binding protein, putative	antisense effect

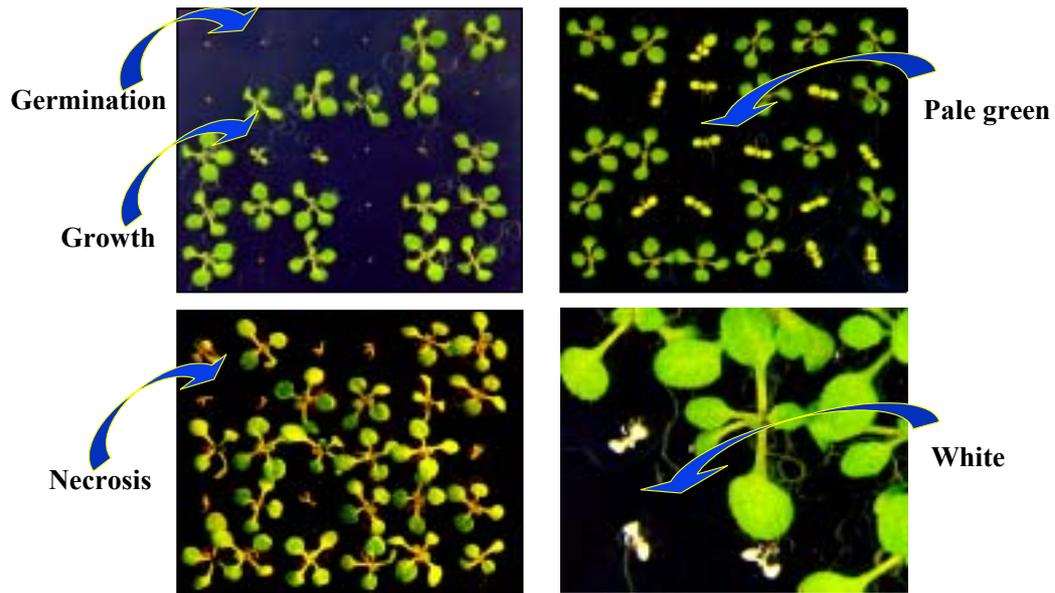


Fig. 3-1-2. Lethal-like phenotypes of *Arabidopsis* mutants

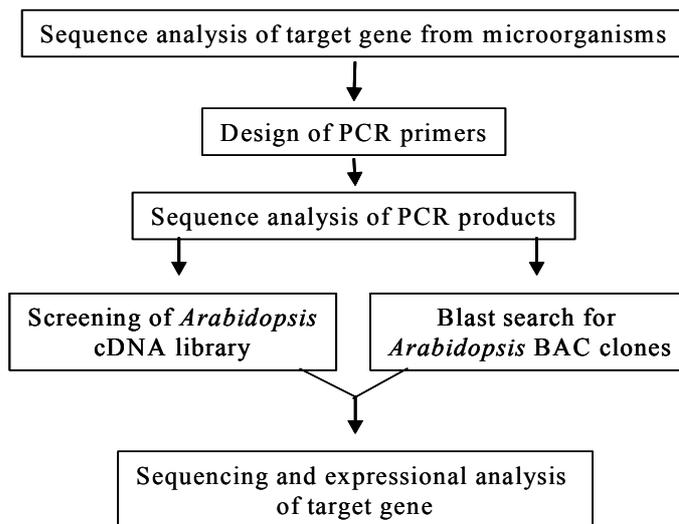


Fig. 3-1-3. Development of lethal-related gene from *Arabidopsis thaliana*.

제 2절 신규 작용점 KAPAS에 대한 연구

1. 서론

Biotin생합성 과정은 미생물과 식물체에만 존재하는 대사경로이기 때문에 사람은 반드시 식물체를 통하여 vitamin을 흡수하여야 한다. 따라서 이를 대상으로 개발하는 제초제는 체내로 흡수된다 하여도 관여할 작용점이 없기 때문에 인체에 대한 독성이 나타나지 않거나 아주 낮은 것으로 예측할 수 있다. Biotin 생합성 경로(Fig. 3-2-1)에는 5가지 효소가 연속적으로 작용하게 되며 미생물과 식물에서 공통적이기 때문에 강력한 효소활성 저해제를 발굴하게 된다면 단일물질로서 제초제와 살균제로 활용할 수 있게 될 수도 있다. 지금까지 biotin 생합성 경로와 KAPAS에 대한 정보는 돌연변이체를 통하여 미생물로부터 확인되었는데 생존에 필수적인 효소로 밝혀져 있다. 그러나 식물체에서는 아직까지 보고된 내용이 전혀 없는 실정이다.

7-keto-8-aminopelagonic acid synthetase(KAPAS)는 식물과 미생물에만 존재하는 biotin 생합성 과정에 관여하는 효소이다. Biotin(vitamin H)은 식물과 미생물 체내에서 일어나는 모든 carboxylase와 transcarboxylase의 필수 조효소이다. Biotin의 합성 과정은 식물과 미생물에서 유사하기 때문에 이 과정에 관여된 효소들은 제초제와 살균제 개발을 위한 공통 target으로 매력적이다. 대장균(*Escherichia coli*)에서 biotin 생합성을 촉매 하는 효소는 4가지 유전자(*bioA*, *bioB*, *bioD*, *bioF*) 산물이다. *bioF*의 산물인 KAPAS는 첫 번째 과정을 촉매 하는 pyridoxal 5'-phosphate(PLP) 의존효소로서 pimelyl CoA와 L-alanine의 탈탄산축합반응으로 7-keto-8-aminopelagonic acid와 CoA, CO₂를 생성한다(Fig. 3-2-2).

KAPAS는 PLP 의존효소들 중에서 α -family에 속하지만 구조적으로는 다른 PLP-의존효소들과는 달리 aminotransferase type II의 dialkylglycine decarboxylase와 아주 밀접하게 관련되어 있다. KAPAS의 아미노산 서열을 비교하면 다른 3개의 α -oxoamine synthase(5-aminolevulinatase synthase, serine palmitoyltransferase, 2-amino-3-oxobutyrate CoA ligase)들이 지니고 있는 활성부위 잔기 대부분이 보존되어 있다. 최근의 연구결과 PLP 조효소는 Lys236에 imine linkage로 공유결합 되어 있고, His133과 His207의 염기성 잔기와 상호작용을 하고 있는 것으로 확인되었다. 이와 같은 사실은 기질과의 결합 또는 촉매작용에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있을 것이다.

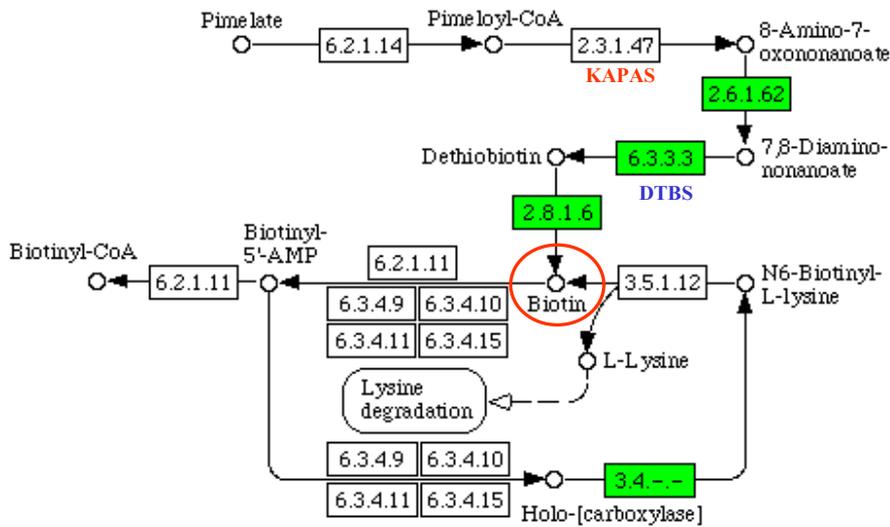


Fig. 3-2-1. Biotin Metabolism in *E. coli*.

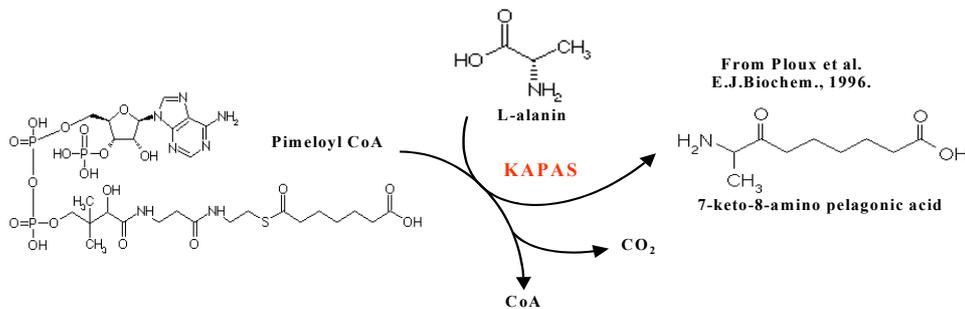


Fig. 3-2-2. Mechanism of 7-keto-8-aminopelagonic acid synthesis.

2. 재료 및 방법:

가. Antisense 기법을 이용한 작용점 확인

*Arabidopsis thaliana*의 재배: *Arabidopsis thaliana*(Colombia) 표준형과 형질전환 식물체는 22°C의 growth chamber(16h-light/8h-dark)에서 토양을 담은 포트 또는 1/2세기의 Murashige and Skoog(MS) 배지(Sigma, St. Louis, Mo., USA)에 2%(W/V) sucrose, pH 5.7, 0.8%(W/V) agar를 용해시킨 Petri-dish에서 생육시켰다. 화분에서 재배할 때는 22°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 growth chambers 내에서 배양하였다.

RNA 추출과 cDNA library의 제조: 애기장대 cDNA library를 만들기 위해서 여러 분화단계의 애기장대 잎으로부터 TRI 시약(Sigma, USA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부터 mRNA 분리 키트(Pharmacia, USA)의 protocol에 따라 poly(A)⁺ RNA를 분리하였다. Primer로 *NotI*-(dT)₁₈을 이용하여 poly(A)⁺RNA와 cDNA 합성 키트(Time Saver cDNA synthesis kit, Pharmacia, USA)로 이중 가닥의 cDNA를 제조하였다.

AtKAPAS에 대한 유전자 분리: *KAPAS*에 대한 유전정보를 BLAST, TAIR 등의 *Arabidopsis* D/B를 통하여 조사하였고, 탐색된 *KAPAS* 유전자의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *Bam*HI의 서열이 포함된 정방향 primer와 제한효소 *Hind*III의 서열이 포함된 역방향 primer를 합성하였다. 이후 상기 두 primer를 사용하여 애기장대 cDNA library로부터 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

DNA와 RNA 조작 및 분석: 식물체 DNA와 플라스미드 DNA를 단리 시키고, 국부적 분리, 변조, ligation, polymerase chain reaction(PCR), agrose와 polyacrylamide gel을 이용한 전기영동, 형질전환 *E. coli* 및 *Agrobacterium* 의 제작 및 배양, DNA gel blot 분석(Southern, 1975) 등은 Sambrook et al.(1989)의 표준방법을 약간 변형시켜 수행하였다. RNA gel blot(northern) 분석은 다음과 같이 수행하였다. 10 μ g의 RNA를 변성시키고, 1.2% form aldehyde-agarose gels를 이용하여 크기별로 분획하여 nylon membranes(ICN, Costa Mesa, Calif., USA)에 올려놓았다. 이를 hybridization시키고 부착되지 않은 DNA 조각들은 Oh et al.(1996)의 방법에 준하여 세척하였다.

cDNA library construction: *A. thaliana*의 잎으로부터 얻은 모든 RNA를 poly(A)⁺RNA로 제작하였다. 5 μ g의 poly(A)⁺RNA와 primer로 *NotI*-(dT)₁₈를 사용하여 Time Saver cDNA synthesis kit(Pharmacia, Piscataway, N.J.,USA)에서 2중나선의 cDNA를 합성 제작하였다.

형질전환 *E. coli*로부터 AtKAPAS protein의 발현: Primer로 KAPAFB(5'

GGCGGATCCTTCGCCCAAATCACAATTC 3')와 KAPARH(5' GGCAAGCTTTTCACT GACAATATCAGAAACAA 3')를 합성한 후 *Bam*H1와 *Hind*III를 이용하여 AtKAPAS cDNA의 full-length를 확인하였으며, PCR을 통하여 AtKAPAS의 모든 염기서열을 코드화 하였다. PCR을 통하여 만들어진 조각들은 pCAL-n vector (Stratagene)에 접합시켜 pCKAPA를 제작하였다. pCKAPA vector를 삽입시킨 *E. coli*는 Luria broth media(LB, 200 ml Erlenmeyer flasks)에 넣고 100 μ g의 ampicillin/ml을 첨가하여 37°C에서 A₆₀₀=1.0까지 배양시켰다. 이를 원심분리 하여(4,000xg, 15 min) 집균하고 1 mM isopropyl-D- thiogalactoside(IPTG)를 처리하여 2시간동안 동일한 조건에서 추가 배양하였다. 이를 원심분리하여(4,000xg, 15min) 집균하고 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 50mM MgSO₄ and 0.4M NaCl)으로 세척한 후 원심분리하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

Antisense AtKAPAS construct 제작 및 *Arabidopsis thaliana*로의 형질전환:
AtKAPAS의 DNA full-length를 얻기 위하여 KAPAF(5' GCAGATCTTCGCCCAAAT CACAATTC 3')와 KAPAR(5' GCAGATCTTTCACTGACAATATC AGAAACAA 3')를 합성하였다. PCR을 통하여 만들어진 산물에 *Bgl*II으로 digestion한 후 pCSEN vector에 삽입하였다. 이로서 반대방향으로 정렬된 pCSEN-K을 강력한 비특이성 promotor SEN1을 cauliflower mosaic virus 35S promoter 대신 사용하여 만들었다. 이를 *Arabidopsis*에 전이시키기 위한 *Agrobacterium*은 28°C에서 0.8~1.0의 OD₆₀₀ 까지 배양한 후 25°C, 5,000rpm에서 10분 동안 원심분리(Sorvall RC5C; DuPont, Wilmington, Del., USA)하였다. Bacteria pellet은 Infiltration Medium(IM 1MS salts, 1 B₅ vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77)에 현탁시켜 최종적으로 OD₆₀₀값 2.0~2.4까지 배양하였다. 4주일동안 생육시킨 애기장대를 *Agrobacterium* 현탁액에 침지시킨 후 vacuum chamber에 넣고 10⁴ Pa에서 10분 동안 침투시켰다. 이를 꺼내어 polyethylene foil로 24 h동안 두었다. 이후 계속적으로 성장시켜(T₁) 종자를 채종하였다. 이때 형질 전환시키지 않은 wild-type과 antisense AtKAPAS가 포함되지 않은 plasmid(pCSEN-K)만 전이시킨 것을 동일하게 재배 채종하였다.

Antisense AtKAPAS construct가 형질전환된 T₁ 애기장대의 lethality 확인:
T₁ 애기장대 종자를 0.1% Basta용액에 30분 동안(Saito et al., 1992) 침지시킨 후

5,000개의 형질전환종자를 5 μ M의 biotin을 첨가한 것과 첨가하지 않은 MS배지로 조성한 agar plate(Petri-dish)에 파종하였다. 한편 풋트 시험에서는 모래배지에 종자를 파종하고 1mM biotin을 포함한 용액과 포함하지 않은 용액을 매일 공급하면서 재배하였다(Schneider et al., 1989). 5000개의 종자로부터 basta 처리에 의해 선발된 식물체 중에서 고사개체를 조사하여 치사율로 환산하였다.

AtKAPAS 유전자 antisense construct 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석: *Bg*III 부위가 포함된 primer를 이용하여 AtKAPAS 유전자에 대한 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 DNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bg*III로 절단하고, pSEN 벡터에 antisense construct를 가진 재조합 vector를 제작하였다. 상기 재조합 vector를 *Agrobacterium tumefaciens*에 electroporation방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환 된 *Agrobacterium*을 28°C에서 O.D.₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 배양하고, 25°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 균체를 포집하였다. 포집된 균체를 최종 O.D.₆₀₀값이 2.0이 될 때까지 Infiltration Medium(IM, 1X MS Salts, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에서 배양 하였다. 생장실에서 4주 동안 생육시킨 애기장대를 *Agrobacterium* 현탁액에 침지시키고 10분 동안 10⁴Pa의 vacuum chamber에 두었다. 침지 후 형질전환된 애기장대를 계속 생장시켜 종자(T₁)를 수확하였다.

T₁ 형질전환 애기장대의 특성 분석: 형질전환 시킨 애기장대에서 수확한 종자를 0.1% Basta((주)경농) 용액으로 30분 동안 침지시키고 배양 선별하였다. 형질전환된 애기장대가 대조군과 비교하여 어떤 생리적 현상 장애를 일으키는 지를 확인하고 이를 통하여 대상 유전자가 제초제 개발에 대한 신규 작용점이 될 수 있는 지를 확인하였다.

단백질의 발현 유도: 증폭된 AtKAPAS cDNA 단편을 *Bam*HI 제한효소와 *Hind*III 제한효소로 절단하고, pCAL-n vector(Stratagene, USA)의 *Bam*HI 제한효소와 *Hind*III 제한효소 부위에 클로닝하여 재조합 vector를 제작하였다. 상기 재조합 vector를 대장균 BL21-Gold (Stratagene, USA)에 형질전환 시킨 후, ampicillin이 100 μ g/ml 포함된 LB(USB, USA) 배지에서 O.D.₆₀₀ 값이 0.7이 될 때까지 37°C, 150rpm으로 교반 배양하였다. AtKAPAS 단백질이 대장균 체내에서 과다 발현되도록 상기

현탁액에 IPTG를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가한 후에 2시간 더 배양하였다. 배양된 대장균을 50mM MgSO₄와 0.4M NaCl이 포함된 50mM-potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 세척한 후, 다시 4,000×g에서 15분 동안 원심분리하고, 침전물을 모아 -20°C에 보관하였다.

단백질의 정제: 상기의 대장균 침전물을 CaCl₂ binding buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM β-mercaptoethanol, 1.0mM magnesium acetate, 1.0mM imidazole, 2mM CaCl₂)에 현탁 시킬 때, 현탁액에 lysozyme을 최종 농도 200μg/ml이 되도록 첨가하고, 15분 동안 회전시킨 후, 30초 동안 초음파를 처리하여 균체를 파손시켰다. 파손된 시료를 5분 동안 얼음에서 냉각시키고, 동일한 과정인 초음파처리 후 냉각을 3회 반복 실시하였다. 상기 시료를 10,000×g에서 5분 동안 원심 분리하였고 상정액을 모아 calmodulin affinity chromatography를 이용하여 정제하였다. 이러한 과정은 electrophoresis를 통하여 확인하였다.

단백질의 효소활성도 분석: 상기 분리된 단백질이 본래의 기능을 갖고 있는지 확인하기 위하여 기질을 합성 또는 구매하여 효소 활성도를 측정한다. -70°C에 보관중인 AtKAPAS 형질전환 대장균을 ampicillin이 100μg/ml 포함된 LB배지 plate에 streak하여 28°C에서 24시간 배양하였다. Single colony를 취하여 ampicillin이 100 μg/ml 포함된 LB 액체배지로 옮겨 O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 될 때까지 37°C에서 250rpm으로 교반 배양하였다. AtKAPAS의 대장균 세포내 대량발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG를 최종 농도 1mM이 되도록 첨가한 후에 28°C에서 2시간 더 배양하였다. 배양된 세포를 50mM MgSO₄와 0.4M NaCl이 포함된 50mM-potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 세척한 후, 다시 4,000×g에서 15분 동안 원심분리 하여 침전물을 모아 CaCl₂ binding buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM β-mercapto ethanol, 1.0mM magnesium acetate, 1.0mM imidazole, 2mM CaCl₂)에 현탁 시킬 때, 현탁액에 lysozyme을 최종 농도가 200μg/ml이 되도록 첨가하고, 15분 동안 회전시킨 후, 30초 동안 초음파분쇄를 수행하였다. 분쇄된 시료를 5분 동안 얼음에서 냉각시키고, 이러한 과정(초음파분쇄 후 냉각)을 3회 반복 실시하였다. 상기 시료를 10,000×g에서 5분 동안 원심분리 하여, 상정액과 pellet으로 분리한 후 상정액 속에 녹아있는 AtKAPAS를 calmodulin affinity resin과 함께 서서히 over night 동안

4°C의 cold chamber 내에서 진탕시켰다. 다음 날 충전된 column을 CaCl₂ binding buffer로 씻어 AtKAPAS이외의 용존 단백질을 모두 제거하였다. 세척액 중에 용존 단백질이 없음을 확인한 후 마지막으로 elution buffer를 이용하여 부착되어 있던 AtKAPAS를 fraction collector를 사용하여 1ml씩 분취하였다. 이들을 모두 전기영동하여 AtKAPAS의 용존량을 조사하였고, 단백질 함량을 조사하여 AtKAPAS의 분포를 비교하였다. 동일한 조건에서 AtKAPAS를 형질전환 시키지 않은 정상적인 *E. coli* BL-21에 들어있는 단백질 양상과 비교하였다.

AtKAPAS 활성측정: 상기 단백질의 효소 활성도는 30°C로 조절되는 분광광도계(Backman DU series 60 spectrophotometer)를 사용하여 340nm에서 Alexeev 등(J. Mol. Biol., 284:401-419, 1998)의 방법에 의해 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 반응액 1ml에는 20mM potassium phosphate (pH 7.5), 1mM NAD⁺, 3mM MgCl₂, 0.1 unit α -ketoglutarate dehydrogenase, 정제된 단백질 2-10 μ g이 포함되어 있다. 모든 반응액에서 상기 단백질의 농도는 10 μ M이었다. L-alanine과 pimelyl CoA를 각 반응액에 농도별로 첨가하여 측정하였다. 결과는 Soft-Pac Module kinetics software를 장착하여 분석하였다. 분석 전 효소단백질을 100 μ M pyridoxal 5'-phosphate(PLP)가 포함된 20mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) 용액으로 4°C에서 2시간 동안 dialysis하였다. 효소활성 측정을 위한 대조군으로는 상기 정제된 단백질을 제외한 다른 성분들이 함유된 큐벳을 사용하였다. 상기 정제된 단백질의 효소 활성도는 기질인 pimelyl CoA에 대한 Michaelis-Menten kinetics에 적합하였으며, 기질 각 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여, Lineweaver-Burk's plot로 나타낸 결과 K_m값 및 V_{max}값이 각각 5.4 $\times 10^{-7}$ M 및 7.93으로 나타났다. 이러한 결과는 AtKAPAS 유전자로부터 발현되는 단백질이 pimelyl CoA에 대한 기질 특이성을 갖는 KAPA synthase임을 나타낸다. 또한, 대장균 및 바실러스 스파에리쿠스의 KAPAS의 pimelyl CoA에 대한 K_m 값이 각각 0.5mM 및 2.5mM인데 반해, 분리한 단백질의 K_m값은 5.4 $\times 10^{-7}$ M 로 높게 나타났다. 즉, 상기 단백질이 대장균이나 바실러스와 비교하여 pimelyl CoA에 대한 높은 기질 특이성을 갖고 있음을 알 수 있다.

나. AtKAPAS 효소활성 측정 체제 구축

AtKAPAS cDNA가 형질 전환된 *E. coli* 배양: *A. thaliana*의 KAPAS cDNA가

형질전환된 *E. coli*를 LB 배지에서(100 µg ampicillin/ml 첨가) 1일 동안 배양시킨 (37°C, 250 rpm, A₆₀₀=1.0) 후 원심분리(4,000xg, 15min)로 배양된 *E. coli*를 모았다. 모아진 *E. coli* cell(pellet)을 50 mM MgSO₄와 0.4M NaCl을 용해시킨 50mM potassium phosphate buffer용액(pH 7.0)으로 세척하고 이를 다시 원심분리(4000xg, 15min)하여 침전된 균체를 -20°C에서 보관하였다.

IPTG 처리시간, 온도에 따른 AtKAPAS 생성량 비교: 1 ml의 LB broth에 형질 전환시킨 single colony를 50 µg/ml의 ampicillin과 함께 220-250 rpm으로 37°C에서 overnight시켰다(만일 BL21-CodonPlus strain이나 BL21(DE3) pLysS strain과 같이 pACYC-based plasmid일 경우에는 ampicillin과 함께 50 µg/ml의 chloramphenicol을 함께 넣어주어야 pCAL plasmid를 보호할 수 있음). 다음날 아침 각 tube에서 50 µl씩 꺼내어 새로운 LB broth(항생제 제거) 1 ml에 넣고 220-250 rpm으로 37°C에서 2시간 배양하였다. 각 tube에서 100µl씩 microcentrifuge tube에 담고 gel 분석 시까지 얼음에 꽂아두었다. 이들은 IPTG 처리효과를 확인하는 기준으로 사용하였다. 나머지 배양액에 1 mM의 IPTG를 처리하고 220-250 rpm으로 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양이 완료되면 모두 gel 분석을 위하여 얼음에 꽂아두었다. 각 조건에 따른 microcentrifuge tube로부터 20 µl을 20 µl의 2×SDS gel sample buffer와 함께 혼합하여 새로운 microcentrifuge tube로 옮겼다. 이를 95°C에서 5분 동안 가열하고 전기영동으로 밴드를 분석하였다.

AtKAPAS 대량발현 및 정제: 보관 중인 transgenic *E. coli*를 상기 buffer용액으로 현탁시킨 후 1 mM IPTG를 첨가하고 배양시간과 온도조건을 다르게 하였다. 이를 원심분리(4,000xg, 15 min)하여 집균하고 30 ml CaCl₂ binding buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 1.0 mM magnesium acetate, 1.0 mM imidazole, 2 mM CaCl₂)에 pellet을 현탁 시켰다. 여기에 lysozyme(200 µg/ml)을 첨가시키고 15분 동안 교반 하였다. 이를 Ice bath에 옮기고 30초씩 5회 sonicator로 세포를 파괴시켰다. 원심분리(10000xg, 15min)로 침전시킨 후 상정액을 calmodulin affinity resin이 충전된 column으로 옮기고 4°C, 8시간동안 서서히 흔들어주었다. CaCl₂ binding buffer(50 ml)를 흘려주면서 calmodulin affinity resin에 부착되지 않은 기타 단백질들과 찌꺼기를 모두 씻어주었다. 마지막으로

calmodulin affinity resin에 부착된 효소는 elution buffer로 집균하여 전기영동으로 확인하고 효소활성을 측정하였다.

Calmodulin Affinity Column 준비: 시약용 calmodulin affinity resin(Stratagene)은 20%(v/v) ethanol, 0.1 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)와 500 mM NaCl이 포함된 보관용액과 함께 공급된다. 따라서 calmodulin affinity resin을 사용하기 위해서는 미리 적합한 완충용액으로 평형을 유지시켜야 한다. 먼저 보관용 완충용액을 따라내고 5배의 CaCl₂ binding buffer용액으로 calmodulin affinity resin을 세척하는 과정을 2회 수행하였다. Calmodulin affinity resin과 동량의 CaCl₂ binding buffer용액으로 현탁시킨 후 컬럼에 충전하였다.

Calmodulin Affinity Column 재생: Calmodulin affinity resin은 컬럼부피의 3배 용액(0.1 M NaHCO₃, pH 8.6, 2 mM EGTA)으로 세척하였다. 이어서 컬럼부피의 3배 용액(1 M NaCl, 2 mM CaCl₂)으로 세척하였다. 이어서 컬럼부피의 3배 용액(0.1 M acetate buffer, pH 4.4, 2 mM CaCl₂)으로 세척하였다. 마지막으로(binding buffer, 1-2 mM CaCl₂)로 세척하여 사용하였다. 만일 불활성단백질 또는 지질성분이 제거되지 않을 경우 0.1% nonionic detergent(e.g., Triton[®]X-100)를 37°C에서 1분간 처리하고 이어서 binding buffer로 재 평형 시켰다. 이를 20%(v/v) ethanol에 담아 4°C에 보관하였다.

Thrombin 처리에 의한 CBP purification tag의 제거: CBP fusion protein을 thrombin cleavage buffer에 현탁시키고 일정량의 thrombin을 첨가하여 실온에서 보관한다. 시간 단위로 SDS PAGE로 분석하여 분리가 완료 되면 calmodulin affinity resin과 혼합(2 mM CaCl₂>200 mM NaCl)하여 원심분리(1000xg)로 resin을 분리시킨다. (참고적으로 0.5 mM의 PMSF를 첨가시키면 thrombin은 불활성화 된다.)

다. 기질(pimelyl CoA)의 합성

1단계: [6-(phenylthiocarbonyl)hexanoic acid]의 합성: Pimelic acid(1.5 g, 9.4 mmol)에 과량의 증류 정제된 thionylchloride(2 ml)을 60°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 감압 농축시킨 후 methylene dichloride(2 ml)에 용해시키고 thiophenol(1 ml,

9.1 mmol)을 추가하였다. 30°C에서 1시간 동안 교반시킨 후 2%(w/v) NaHCO₃으로 3회 세척하였다. HCl을 이용하여 pH 1로 조정 한 후 methylene dichloride로 추출하였다. 여기에 Na₂SO₄를 사용하여 건조시키고, silica gel chromatography(cyclohexane/ethyl acetic acid; 15:4:1, by vol.)로 monothioester와 dithioester에 이어서 마지막으로 pimelic acid를 분취하였다. 생성된 6-(phenylthiocarbonyl) hexanoic acid(900 mg; 37% yield)는 결정체로서 m.p. 45~46°C를 지니고 있다.

2단계(Pimelyl CoA)의 합성: Wieland & Rueff의 방법으로 acyl-CoA thioesters의 합성을 위하여 trans-esterification을 수행하였다. 먼저 50mg(65 μmol)의 CoA (lithium salt)를 1ml의 2%(w/v) NaHCO₃ 용액에 녹이고, 35 mg(130 μmol)의 6-(phenylthio carbonyl) hexanoic acid를 0.5ml의 methanol에 녹여 합친 다음 2% (w/v) NaHCO₃를 사용하여 pH 8로 조정하고 상온에서 교반하였다. 반응이 끝난 후 HPLC로 확인하고 conc. HCl를 사용하여 pH 2로 조정하였다. 이 반응액을 diethyl ether로 3회 세척한 다음 감압 농축하였다. 합성된 pimelyl CoA는 HPLC로 분취하였다. 사용한 column은 LiChrospher 100 RP-8e 5 μm(Merck)이었고, 이동상으로는 0.25M-triethyl ammonium phosphate buffer에 15%(v/v) acetonitrile을 용해시킨 pH 5.5 용액(2 ml/min)을 사용하였다. 최종적으로 pimelyl CoA의 농도를 확인하고 -20°C(pH 2)에 보관하였다(Fig. 3-2-3).

효소활성 측정방법 확립: Alexeev 등의 방법에 준하여 1mM α-ketoglutarate, 0.25mM thiamine pyrophosphate, 1mM NAD⁺, 3mM MgCl₂, 0.1 unit의 α-ketoglutarate dehydrogenase를 넣은 20mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 20μl의 KAPAS와 기질인 pimelyl CoA를 첨가하여 총량이 1.5ml이 되게 하였다. 이를 30°C에서 30분 동안 반응시킨 후 KAPAS 활성은 Soft-Pac Module kinetics software를 장착한 Backman DU series 60 spectrophotometer를 사용하여 340nm에서 측정하였다.

96-well을 활용하는 high throughput screening(HTS) system 확립: Alexeev 등의 방법에 준하여 1 mM α-ketoglutarate, 0.25 mM thiamine pyrophosphate, 1 mM NAD⁺, 3 mM MgCl₂, 0.1 unit의 α-ketoglutarate dehydrogenase를 넣은 20 mM

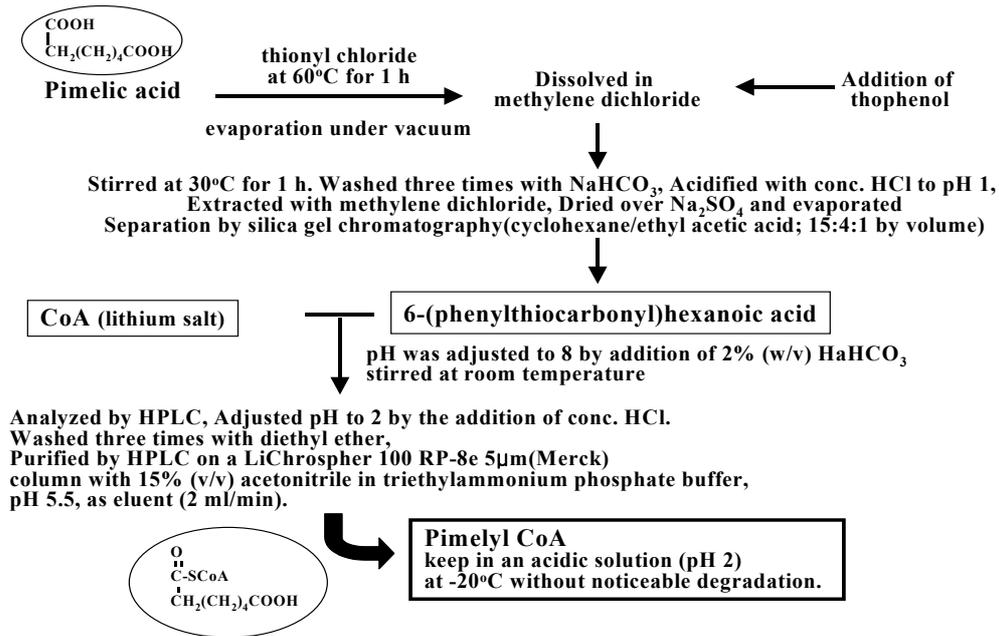


Fig. 3-2-3. Synthesis of substrate Pimelyl-CoA.

potassium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 10 µl의 KAPAS와 기질인 pimelyl CoA를 첨가하여 총량이 250 µl이 되게 하였다. 이를 30°C에서 30분 동안 반응시킨 후 KAPAS 활성은 microplate reader를 사용하여 340nm에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

*Arabidopsis thaliana*의 KAPAS(AtKAPAS) cDNA 확인: 식물체내의 AtKAPAS의 유전자 code를 확인하기 위하여 *Arabidopsis* 게놈 sequence를 *E. coli*, *B. subtilis*, and *B. sphaericus*의 *bioF* sequence를 이용하여 스크리닝 하였다. PCR amplification으로 분리한 cDNA를 유전자 은행에서 분석한 결과 AtKAPAS 유전자는 1,410개의 염기 쌍(bp) open reading frame(ORF)으로 구성되어 있고, 이는 469개의 아미노산으로 구성된 단백질로 51.3kDa의 분자량으로 추정되었다(Fig. 3-2-4, 3-2-5). AtKAPAS의 아미노산 서열을 *E. coli* (GeneBank accession number NP-286539), *B. subtilis*(GeneBank accession number NP-390900), *B. sphaericus* BioF(GeneBank accession number JQ0512)와 정렬하여 비교한 결과 AtKAPAS는 각각 28%, 34%, 38%씩 아미노산이 일치하였다. 또한 *E. coli* BioF, *B. subtilis* bioF, *B. sphaericus* BioF와는 각각 43%, 52%,

54%씩 아미노산 유사성을 보여주었다(Fig. 3-2-6). 그림 3-2-7에서 알 수 있듯이 AtKAPAS는 aminotransferase class I과 II domain을 C-terminal부위에서 찾을 수 있었고, plasma membrane spanning 부위도 존재함을 알 수 있었다.

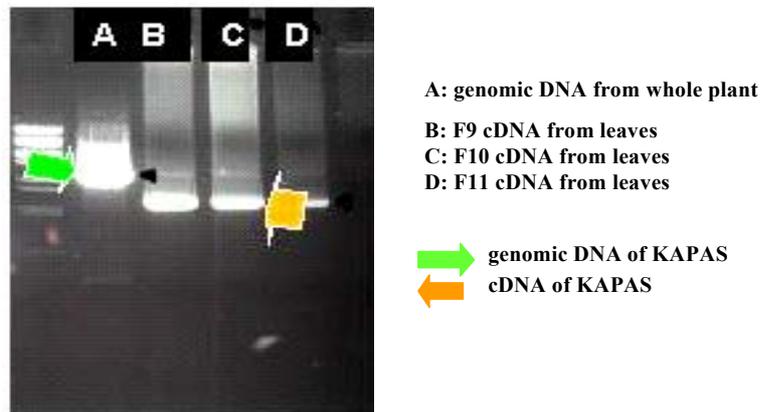


Fig. 3-2- 4. AtKAPAS ORF isolation from cDNA through PCR amplification.

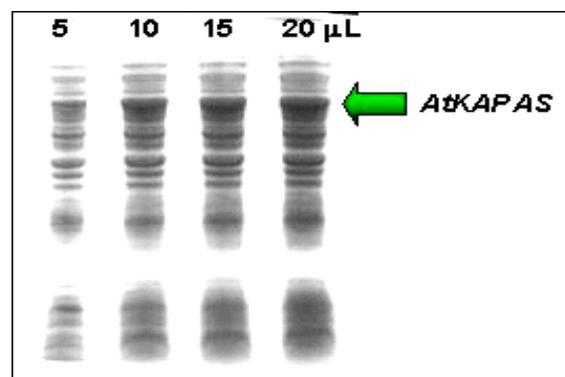


Fig. 3-2-5. Expression of AtKAPAS using pCALn vector in the expression strain.

Intracellular Localization; plasma membrane—Certainty=.600(Affirmative)

• single, fully conserved residue, - conservation groups

```

ERWHE_bioF -----MSWQQRIDTALATRRAADALRRTRRVVEQAGRWLTVGD-----
Eco1i_bioF -----MSWQEKINAALDARRAADALRRRYPVAQAGRWLVADD-----
SERMA_bioF -----MSWQRIEQALAEERLNAAYRRRQITTEGGNGRQIRLGD-----
BACSH_bioF MNDR-----FRRELVQVEEQGLTRKLR--LFSTGNESVVMNG-----
AtKAPAS  MADHSWDKTVLEAVNVLERSQILRLSRPICMSRQNEEEIVKSRANGGDGYEVFDGLCQWDRTSVEVSVSIPTFQKWLHDE
           . . . * * * * * . . .

ERWHE_bioF -----SRYCNFSSNDYLGLSQHFATVRAWQQGAEDYGVGSGGSGHVSQYTRAHYALESELAEWL
Eco1i_bioF -----RQYLNFSNDYLGLSHFPQITRAWQQGAEDYGIQSGSGGHVSYVYVHQALEELAEWL
SERMA_bioF -----RLYLNFSNDYLGLSQDARVIAAWQGGAR-YGVGNNGSGHVTGFSAHQALEEQLAAWL
BACSH_bioF -----KKFLLFSSNNYLGLATDSRLKKKATEGISKYGTGAGGSR.LTTGNFDIHEQLSEETADFK
AtKAPAS  PSNGEEIFSGDALAECRKGRFKLLLSFSGNDYLGLSSHFTISNAANAVKEYGMGPKGSALICGYTTYHRLLESLSLAQLK
           . . * * * * * . . .

ERWHE_bioF GYPRALLFISGF AAN-----QAVIAALTGKEDR-----IVADKLSHASLLEAASFS---PAQLRRFAHNDVSQLA
Eco1i_bioF GYPRALLFISGF AAN-----QAVIAAMMAKEDR-----IAADRLSHASLLEAASLS---PSQLRRFAHNDVTHLA
SERMA_bioF GYPRALLFISGF AAN-----QAVLAALMKGDDR-----ILADRLSHASLLEAAGAV---AGRRAFVPAQSTAGLA
BACSH_bioF KTEAAIVFSGYLAN-----VGVLSVVMKAGDT-----IFSDAWNHAISIIDGCRLS---KAKTIVYEHADMVDE
AtKAPAS  KKEDCLVCPTGF AANMAAMVAIGSVASLLAAASGPKLKNEKVATIFSDALNHASIIDGVR.LAERQGNVEVFVYRHCDISNCK
           . . . * * * * * . . .

ERWHE_bioF AL-LDKPCDGQLAVTEGVFSMDGDSAPLAETAQVRRAGAWLLVDDAHGIAVTDGHHGRGSCQQQ--EVKPELLLVTFGK
Eco1i_bioF RL-LASPCPGQQMVVT EGVFSMDGDSAPLAETQQVTQQHNGWLMVDDAHGTGVIGEGRGSCWQ--KVKPELLLVTFGK
SERMA_bioF R.TCLAKPCDQGR LAVTEGLFSMDGDSAPLAELHR.LTR.AAGAWLMVDDAHGIGVREGEGRGSCWQ--GVRPELLVATFGK
BACSH_bioF RKLRQSHGDGLK FIVTDGVFSMDGDIAP.LPKIVE.LAK.EYKAYIMIDDAHATGVLGNDGCGTADYFGLKDEIDFTVGLSK
AtKAPAS  MKR-----KVVVTD.SLFSMDGDFAPMEELSQLRKYGFLLVDDAHGT FVCGENGGGVAEEFNCEADVLCVGLTSK
           . . * * * * * * * * . . .

ERWHE_bioF GFGVSGAAVLCSEAVATYFEQFARHLIY STSMPPAQAVALSAA.LSVIRGEEGDQRRTALAGLIQR.FRHGAALPGRITHS
Eco1i_bioF GFGVSGAAVLCSSVYADYLLQFARHLIY STSMPPAQQAALRASLAVIR.SDEGDARR.EKLAALITR.FRAGVQDLPTFLADS
SERMA_bioF AFGVSGAAVLCDEATAEYLLQFARHLIY STSMPPAQCALQAALARIR--EGDDLRA.RLQDNIRR.FRQGAAPLALTLTDS
BACSH_bioF AIGAEQGFVSTSSIAKNYLLNNAR.SFIFQ.TAL.SP.SAIE.AAR.EGI.SIIQ--NEPERRKQLLKNADYLR.LKLEE.SGFVMKEG
AtKAPAS  AAGCHGFIACSKKWKQLIQSRGR.SFIFSTAI.PVPMAAAAY.AVVVAR--KEIWRK.KATWERVKEFK---ELSGVDIS--
           . . * * * * * * * * . . .

ERWHE_bioF QS.AIQPLI.VGDN.SRAL.SLAER.LRQKGCWVT.AIRPPTV.PAGTAR.LR.LT.LTAAHQ.PEDIDR.LL.EVLHESGE-----
Eco1i_bioF CS.AIQPLI.VGDN.SRAL.QLAEK.LRQQGCWVT.AIRPPTV.PAGTAR.LR.LT.LTAAHEM.QDIDR.LL.EVLHGNG-----
SERMA_bioF DT.AIQPLI.VGDN.QR.ALD.LATR.LRECLGWVS.AIRPPTV.PPGGAR.LR.LL.LTAAHQ.SODIDR.LL.EVLNDVSO-----
BACSH_bioF ETP.II.SLI.TGG.SHE.AMQ.F.SAK.LLDEGV.FIP.AIRPPTV.PKGS.SR.LR.ITVMATH.TIEQLDMVI.SKIK--KIGKEMGIV---
AtKAPAS  -S.P.II.SLV.VGNQ.EKALKASRY.LLKSG.FHVAIR.PPTV.PPN.SCR.LR.VT.LSAAHTT.EDV.KKLI.TALSSCLDFONTATHIP.SF
           . . * * * * * * * * . . .
    
```

An AtKAPAS encoded KAPAS of 469 amino acids, and shared extensive amino acid identity to bacteria and yeast KAPAS, ranging from 28% to 38%, respectively.

Fig. 3-2-6. Multiple alignment of putative AtKAPAS.

```

1 atggcggatcatctcgtgggataaaaactgtggaagaagcagtgaaatgcttggaatccaggcaaatctctcgatctttgaggcccatttgc
M A D H S W D K T V E E A V N V L E S R Q I L R S L R P I C
91 atgtctaggcaaaacgaagaagaaatagtgaaaagcagagc caatggaggagacgggtacgaggtgtcgacggtttgtgtcaatgggat
M S R Q N E E E I V K S R A N G G D G Y E V F D G L C Q W D
181 cggacttcagttgaggtgtctgtctcgattcctacatttcagaaatggcttcacgatgaaccagcaacggagaagagatttttagtggga
R T S V E V S V S I P T F Q K W L H D E P S N G E E I F S G
271 gatgcattagctgaggtgtagaaaaggagatcaagaagctgcttttgtctctgggaatgattatttgggtttgagctcacatcctaca
D A L A E C R K G R F K K L L L F S G N D Y L G L S S H P T
361 atatcaaacgctgctgcaaacgcagtc aaagaatatggatggacctaagggttctgctttaatatgtgctataccacttatcatcgt
I S N A A A N A V K E Y G M G P K G S A L I C G Y T T Y H R
451 ttgcttgagctagtttggcgaactgaagaaaaagaggattgtctgtttgtcctactgggtttgtgccaatatggctgcaatgggt
L L E S S L A Q L K K K E D C L V C P T G F A A N M A A M V
541 gcaattggaagtgttgccttctcttttgccgctagcgggaaacctctgaagaatgaaaaagttgccatcttttctgatgcgtgaaatcat
R I G S V A S L L A A S G K P L K N E K V A I F S D A L N H
631 gcatcaattatgtaggtgctcgtcttctgctgaacgacaaggaaatgtgaagttttgtttatcgacactgtgacatatcaaatgcaaa
A S I I D G V R L A E R Q G N V E V F V Y R H C D I S N C K
721 atgaagaggaaggtcgtggtgactgatagcttatttagtatggacggtgactttgcaccaatggaagagctctctcagcttcggaagaag
M K R K V V V T D S L F S M D G D F A P M E E L S Q L R K K
811 tatgcttctcttagttattgatgctcatggaacattgtctgtgagaaaacggtggtggcgtggctgaggaaatgaaatgctgaa
Y G F L L V I D D A H G T F V C G E N G G G V A E E F N C E
901 gctgatgtagatttatgtgtgggcaactttgagtaaggcagcagggtgtcattggcgtttcatagcttgagcaaaaaatggaaagcaactg
A D V D L C V G T L S K A A G C H G G F I A C S K K W K Q L
991 atacagtcgagaggtcgttcattcattttcaacagcaatccctgtcccaatggctgcagctgcttatgacagcagttgtagtggcgagg
I Q S R G R S F I F S T A I P V P M A A A A Y A A V V V A R
1081 aaggagatagtgagaagaaggcaaatgggagaggttaaaagagtcaaggaattatctggagttgacatctcaagccccattatctca
K E I W R R R K A I W E R V K E F K E L S G V D I S S P I I S
1171 cttgttgtagggaatcaagagaaaagccctcaaaagcagcgggtatctataaaaatcaggcttccatgtaatggcaatacgcacggcccaca
L V V G N Q E K A L K A S R Y L L K S G F H V M A I R P P T
1261 gtgcccccattcttgcaggctaagggtgacactgagtgacacataccacagaagatgtgaagaaactcatcactgcgctttctctct
V P P N S C R L R V T L S A A H T T E D V K K L I T A L S S
1351 tgtttggactttgacaaacagccactcacattcctccttctatttcccaaatataa 1410
C L D F D N T A T H I P S F L F P K L *

```

Fig. 3-2-7. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the putative AtKAPAS.

Antisense AtKAPAS 형질전환 *A. thaliana*의 형태적 특성분석: AtKAPAS의 기능을 조사하기 위하여 antisense기법을 활용하여 식물체내에 AtKAPAS mRNA를 제거하거나 현저하게 감소시켰다. 이를 위하여 constitutive cauliflower mosaic virus 35S 대신 강력한 비특이성 SEN1 promoter를 사용하여 완전한 AtKAPAS를 antisense AtKAPAS 유전자 DNA로 바꿔치기한 형질전환 식물체를 만들었다. 결과적으로 형질전환 식물체는 대부분 심한 생장저해증상을 보이거나 고사되었다. *Arabidopsis*에서 biotin 생합성 경로와 관계가 있는 배아결손 돌연변이체 *bio1*과 *bio2*는 biotin의 존형 돌연변이체로 확인되었다(Shellhammer and Meinke, 1990; Patton et al., 1998). 따라서 antisense AtKAPAS를 형질전환시킨 애기장대풀도 biotin 의존형인지 여부를 파악하기 위하여 biotin 의존도를 조사하였다(Fig. 3-2-8). 16계열의 형질전환 line이

biotin을 공급한 포트에서 생존하였지만 biotin을 공급하지 않은 포트에는 10계열의 line이 생존하였다. 따라서 6계열의 line은 AtKAPAS 형질이 발현되지 않아서 lethal phenotype(고사)을 보였다. Biotin을 공급하지 않은 포트에서 5개의 형질전환식물체는 심한 성장저해증상을 보이거나, 황녹색의 자엽과 잎을 가지고 있었고 나머지 5개체에는 정상적으로 성장하였는데, 이는 antisense AtKAPAS mRNA의 형질전환율이 다양하기 때문이다. 그러나 biotin을 공급한 포트의 식물체들은 모두 정상적으로 성장하였다. 이상의 결과로부터 antisense construct를 형질전환시킨 애기장대는 biotin 생합성 경로와 관계가 있는 배아결손 돌연변이체 *bio1*과 *bio2*와 같이 biotin 의존형으로 확인되었고, AtKAPAS가 파괴되었을 때 애기장대는 성장초기에 치사되었기 때문에 AtKAPAS 유전자가 발현하는 효소 KAPAS는 신규 제초제 개발에 아주 좋은 작용점으로 확인되었다. 이는 미생물과 식물체에만 존재하며 사람은 음식을 통하여 섭취하여야 하는 vitamin H(biotin)이기 때문에 이를 저해하는 제초제는 인체에 미치는 독성이 전혀 나타나지 않거나 약할 것이기 때문이다.

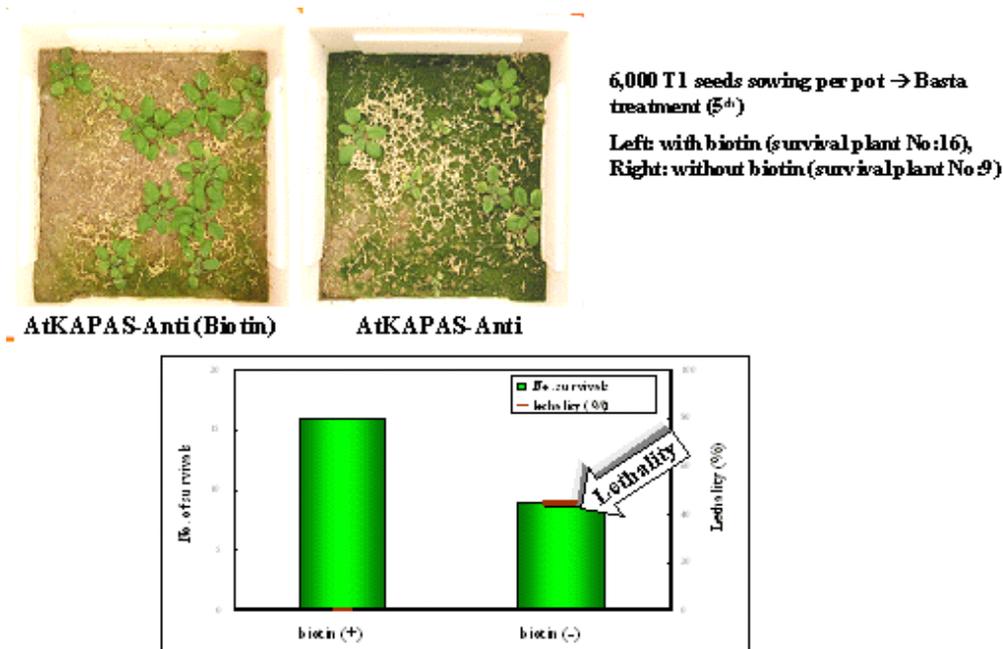


Fig. 3-2-8. Phenotypic characteristics for transgenic plants.

최적 발현조건 확립

IPTG 처리시간에 따른 AtKAPAS 발현: 그림 3-2-9에서와 같이 IPTG를 처리하지 않았을 때에는 55.3kDa의 AtKAPAS 단백질이 희미하게 나타나지만, IPTG를 처리하였을 때에는 상대적으로 진하게 발현된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 IPTG 처리를 4시간까지 연장하여도 1시간 동안 처리한 것과 큰 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 IPTG 처리는 2시간으로 고정하였다.

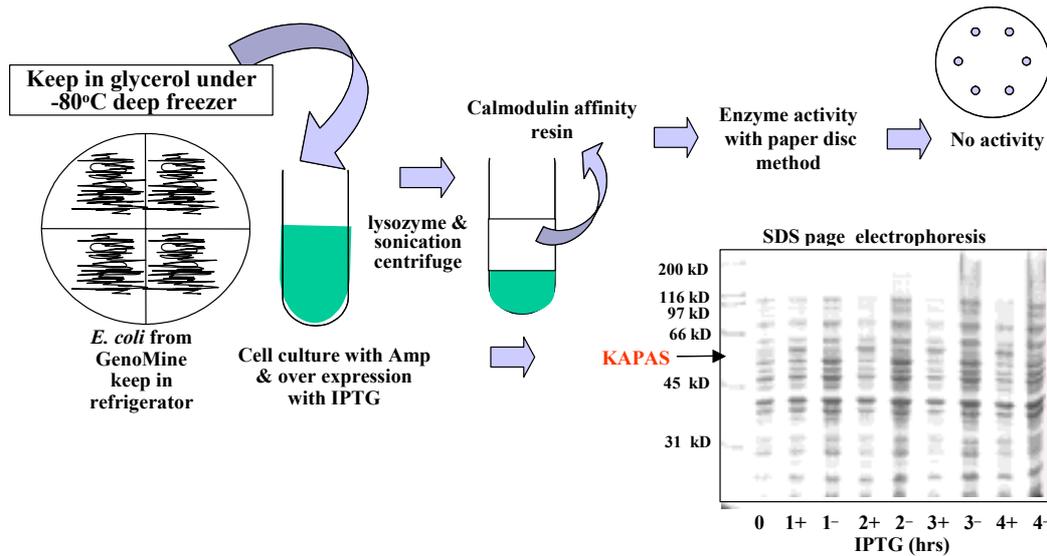


Fig. 3-2-9. Over expression of 1-keto-7,8-diaminopelagonic acid synthase from transgenic *E. coli*.

배양온도에 따른 AtKAPAS 발현 및 분석: 일반적으로 형질전환 대장균의 배양 온도는 37°C로 알려져 있으나, 표적 단백질의 발현이 잘 이루어지지 않거나 용해도가 낮아 상정액으로 용존되어 나오지 않거나, inclusion body를 형성하여 침전될 경우 온도를 낮추었을 때 호전되는 경우가 있음이 보고 되어 있다. AtKAPAS의 경우에도 마찬가지로 용존량이 침전량에 비하여 상대적으로 적은 것을 확인하였고, 이를 해결하고자 28°C에서 배양한 결과를 비교하였다. 정상적인 배양 온도 37°C에서 배양한 경우보다 28°C에서 배양한 결과 용존량이 증가함을 확인하였지만 여전히 침전물 층에 포함된 AtKAPAS 단백질의 양이 상대적으로 많았다. 따라서 보다 효과적인 방법을 통하여 용존량을 증가시키지 않으면 안 될 것으로 판단되었다 (Fig. 3-2-10).

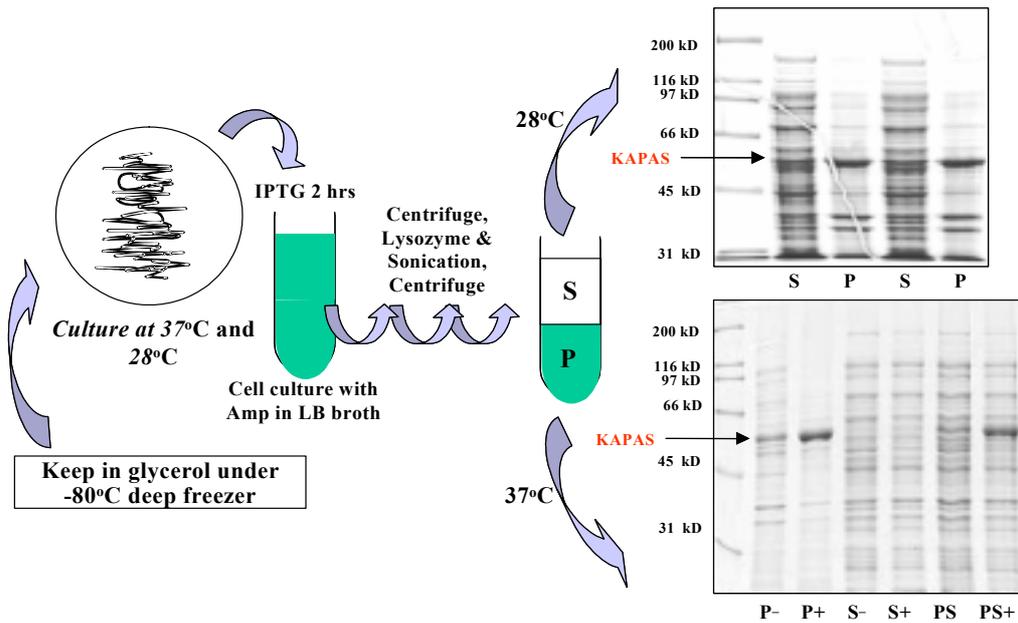


Fig. 3-2-10. Effect of temperature on the expression pattern of 1-keto-7,8-diaminopelagonic acid synthase from transgenic *E. coli*. S, supernatant; +, with IPTG; without IPTG.

발현된 AtKAPAS의 용존량 증대방법 확립: 효소활성을 측정하고 화합물은행이 보유하고 있는 65,000여 화합물의 저해활성을 측정하기 위해서는 많은 양의 AtKAPAS 단백질의 확보가 필요하다. 따라서 계면활성제를 이용하여 용존량을 증대시키고자 하였다. 상기 실험방법으로 배양한 후 집균하고 lysozyme과 초음파 처리로 세포를 파괴시킨 후 guanidine(6M), urea(8M), 및 sodium dodecyl sulfate(SDS, 1%)를 처리하여 용해시켰다. 이를 10,000×g에서 5분 동안 원심분리하여, 상정액과 pellet으로 분리한 후 각 부위의 AtKAPAS 단백질을 SDS-PAGE electrophoresis로 확인하였다. 처리한 buffer solution 중에서 guanidine과 urea는 AtKAPAS의 용존율에 영향을 주지 못하였지만 SDS를 사용할 경우 상정액으로 AtKAPAS 단백질이 약 40%정도 용존 되는 것을 확인하였다. SDS 처리농도를 변화시킨 결과 그러나 buffer solution으로부터 SDS를 제거하는 작업이 용이하지 않기 때문에 다른 대책을 강구하기로 하고 10% 정도의 soluble part를 이용하여 효소활성 측정방법을 확립하기로 하였다(Fig. 3-2-11).

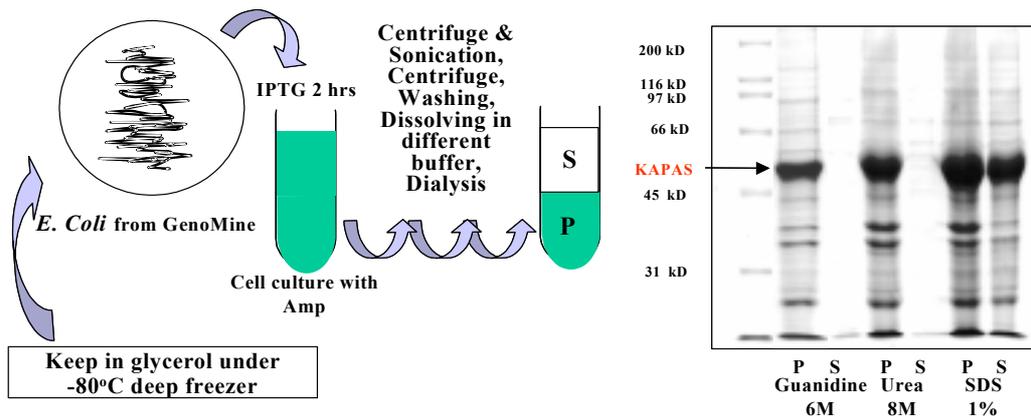


Fig. 3-2-11. Electrophoresis bands of the AtKAPAS dissolving in different surfactants.

또 다른 방법으로 Pellet의 세척 및 재추출을 시도하였다. 즉, 상기 실험방법으로 배양한 후 배양액 500ml로부터 4,000×g에서 15분 동안 원심분리 하여 집균하고 lysozyme과 초음파 처리로 세포를 파괴시킨 후 20,400×g에서 16분간 원심분리 하였다. 상정액을 버리고 이를 CaCl₂ binding buffer(CBB)로 2회 세척 후 동일 buffer 10ml로 재 현탁 시켜 초음파 처리로 재 파괴시킨 후 20,400×g에서 3분 동안 원심분리 하였다. 상정액과 침전물로 분리한 후 침전물은 다시 동일한 방법으로 재분리 하였다. 분리된 상정액 중에 용존 되어 있는 AtKAPAS 단백질을 SDS-PAGE electrophoresis로 확인하였다. 교과서적인 방법에서는 AtKAPAS 단백질이 membrane binding form으로 얻어지는데 이를 CaCl₂ binding 완충용액을 사용하여 다시 한번 초음파 처리를 이용하여 막을 파괴시킨 후 20,400×g에서 3분정도 짧게 원심분리 하여 침전시킨 결과 상정액에 많은 양의 AtKAPAS 단백질이 용존되어 있음을 확인할 수 있었다. 이로서 기존의 방법보다 10배 이상 많은 양을 확보함은 물론 1차 원심분리를 이용하여 AtKAPAS 이외의 용존 단백질을 제거할 수 있기 때문에 순수한 AtKAPAS 단백질의 분리효과는 크게 향상되었다. 이러한 방법은 아직까지 어느 문헌상에도 소개되지 않은 방법이며, AtKAPAS 단백질 분리에 특이적으로 적용할 수 있는 방법이 개발된 것이다(Fig. 3-2-12).

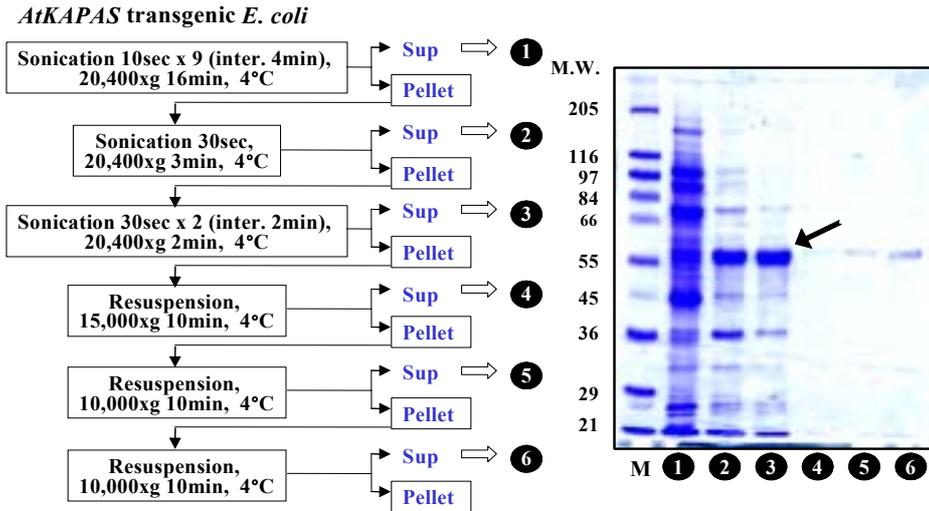


Fig. 3-12. Procedure of *AtKAPAS* separation from transgenic *E. coli* to supernatant after different centrifuge and sonification conditions.

발현된 *AtKAPAS*의 활성측정(용존 상태의 *AtKAPAS* 확보): 상기 단백질의 효소 활성도는 30°C로 조절되는 spectrophotometer(Backman DU series 60 spectrophotometer)를 사용하여 340nm에서 Alexeev 등(*J. Mol. Biol.*, 284:401-419, 1998)의 방법에 의해 측정하였다(Fig. 3-2-13). 효소활성 측정을 위한 반응액 1ml에는 20mM potassium phosphate(pH 7.5), 1mM NAD⁺, 3mM MgCl₂, 0.1 unit α -ketoglutarate dehydrogenase, 정제된 단백질 2-10 μ g이 포함되어 있다. 모든 반응액에서 상기 단백질의 농도는 10 μ M이었다. L-alanine과 pimelyl CoA를 각 반응용액에 농도별로 첨가하여 측정하였다. 결과는 Soft-Pac Module kinetics software를 장착하여 분석하였다. 분석 전 효소단백질을 100 μ M PLP(pyridoxal 5'-phosphate)가 포함된 20mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 용액으로 4°C에서 2시간 동안 dialysis하였다. 효소활성 측정을 위한 대조군으로는 상기 정제된 단백질을 제외한 다른 성분들이 함유된 큐벳을 사용하였다. 상기 정제된 단백질의 효소 활성도는 기질인 pimelyl CoA에 대한 Michaelis-Menten kinetics에 적합하였으며, 기질 각 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여, Lineweaver-Burk's plot로 나타낸 결과 K_m 값 및 V_{max} 값이 각각 5.4×10^{-7} M 및 7.93으로 나타났다. 이러한 결과는 *AtKAPAS* 유전자로부터 발현되는 단백질이 pimelyl CoA에 대한 기질 특이성을 갖는 KAPA synthase임을 나타낸

다. 또한, 대장균 및 바실러스 스파에리쿠스의 KAPAS의 pimelyl CoA에 대한 K_m 값이 각각 0.5mM 및 2.5mM인데 반해, 분리한 단백질의 K_m 값은 $5.4 \times 10^{-7} M$ 로 높게 나타났다. 즉, 상기 단백질이 대장균이나 바실러스와 비교하여 pimelyl CoA에 대한 높은 기질 특이성을 갖고 있음을 알 수 있다(Fig. 3-2-14).

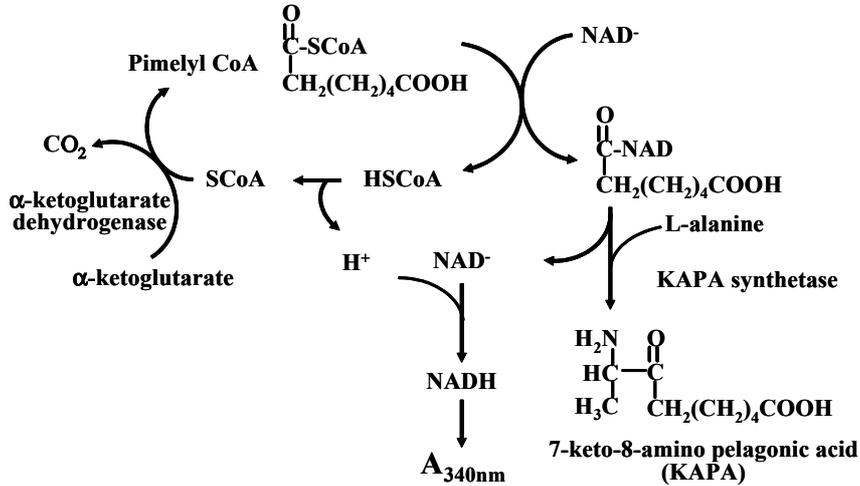


Fig. 3-2-13. Proposed reaction mechanism for detecting activity of 7-keto-8-amino pelagonic acid synthase purified from transgenic *E. coli*.

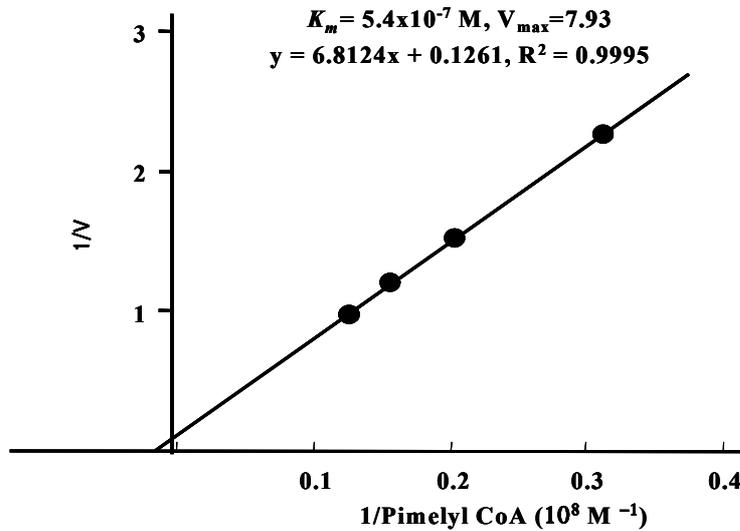


Fig. 3-2-14. Lineweaver-Burke plot of the 7-keto-8-aminopelagonic acid synthase activity.

이상과 같이 KAPAS에 대한 효소 정제 및 활성 측정방법을 구축하였다. 또한 “KAPA 신타제 효소 기능을 갖는 식물의 신규 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드의 발현을 저해하여 식물생장 억제 및 치사를 유발하는 방법”으로 대한민국 특허출원하였고, 이어서 “Novel polypeptide having function of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase of plant and method for inducing growth inhibition and lethality by suppressing expression of the polypeptide”로 PCT 특허출원하였다. 현재 한국화학연구원에서 보유하고 있는 화합물 은행의 화합물을 시험하였다.

pCal-AtKAPAS solubility 분석: Primer로 KAPAFB(5' GCGGATCCTTCGCCC AAATCACAATTC 3')와 KAPARH(5' GGCAAGCTTTTCACTGACAATATCAGAAAC AA 3')를 합성한 후 *Bam*H1와 *Hind*III를 이용하여 *AtKAPAS* cDNA의 full-length를 확인하였으며, PCR을 통하여 *AtKAPAS*의 모든 염기서열을 코드화 하였다. PCR을 통하여 만들어진 조각들은 pCAL-n vector(Stratagene)에 접합시켜 pCKAPA를 제작하였다. pCKAPA vector를 삽입시킨 *E. coli*는 Luria broth media(200ml Erlenmeyer flasks)에 넣고 50mg의 ampicillin/ml을 첨가하여 37°C 200rpm에서 A₆₀₀=0.6까지 배양시켰다. 이를 원심분리하여(4,000xg, 15 min) 집균하고 1 mM IPTG를 처리하여 28°C 200rpm에서 5시간동안 추가 배양하였다. 이를 원심분리하여(4,000xg, 15min) 집균하고 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 50mM MgSO₄ and 0.4M NaCl)으로 세척한 후 원심분리하여 Ice bath에 옮기고 30초씩 5회 sonicator로 세포를 파괴시켰다. 원심분리(10,000xg, 15min)로 침전시킨 후 상징액(soluble fraction)과 침전물(insoluble fraction)을 전기영동으로 확인하였다. Lane 2의 total fraction이 lane 3과 lane 4의 insoluble fraction과 soluble fraction으로 나뉘어 존재하는 것을 확인하였다 (Fig. 3-2-15).

신규 제초제 후보 화합물 탐색 및 약효검색(스크리닝): 신규 작용점 *AtKAPAS*의 vector system을 개선하여 solubility를 증진시키는데 성공하였고, 이를 이용하여 화합물은행의 대표화합물 10,000개 중에서 hit를 탐색할 수 있도록 고속약효검색체계를 구축하였다.

AtKAPAS 고속약효검색체제 확립 및 HIT 탐색: *AtKAPAS*는 약 51.3kDa의 분자

량으로 469개의 아미노산을 암호화하는 1,410bp크기의 전사해독틀(open reading frame)을 포함하고 있으며, 상기 아미노산 서열은 C-말단 부위에 aminotransferase class I 및 class II 도메인을 포함하고 있어 KAPAS 기능 이외에 aminotransferase 기능을 수행할 수 있음을 추정할 수 있다. 또한, 상기 아미노산 서열은 plasma membrane spanning region으로 추정되는 도메인을 포함하고 있어 본 효소가 plasma membrane에서 작용할 것이라 추정할 수 있다. 따라서 예측한 바와 같이 *E. coli*를 이용하여 AtKAPAS의 발현은 순조롭게 진행되었지만, 효소를 정제하는 과정에서 10% 이내로 용출됨을 확인하였다. 10% 정도의 solubility를 가진 효소를 효율적으로 정제하기 위해서 1차 년도에는 분별 원심분리방법을 이용하여 효소정제율을 증진시켰지만 65,000여개의 화합물을 대상으로 고속약효검색체계를 구축하기에는 역부족이었다. 따라서 MBP fusion AtKAPAS vector를 이용하여 성공적으로 solubility를 증진시키는데 성공하였다. 이들의 내용을 정리하면 다음과 같다.

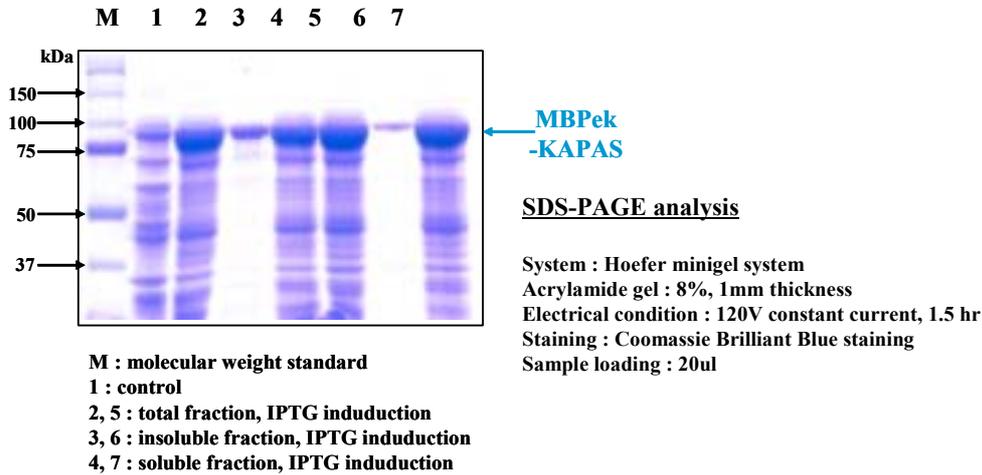


Fig. 3-2-15. Electrophoresis of pCal-KAPAS.

다음으로는 calmodulin affinity column chromatography를 이용하여 분획하였다. Bio-rad HR system을 사용하였고 column은 1.1 cm x 30 cm(Millipore, USA), resin은 Calmodulin affinity resin(Stratagene), bed volume은 10ml이었고, binding buffer는 CaCl₂ binding buffer, elution buffer는 50 mM Tris-HCl(pH8.0), 10 mM β-mercaptoethanol, 2 mM

EGTA, 150 mM NaCl을 사용하였다. Flow rate는 1ml/min으로 20ml를 loading하였다. 그 결과 soluble fraction(Fig. 3-2-16)은 물론 insoluble fraction(Fig. 3-2-17)에서 아주 적은 량만이 resin에 부착됨을 알 수 있었다.

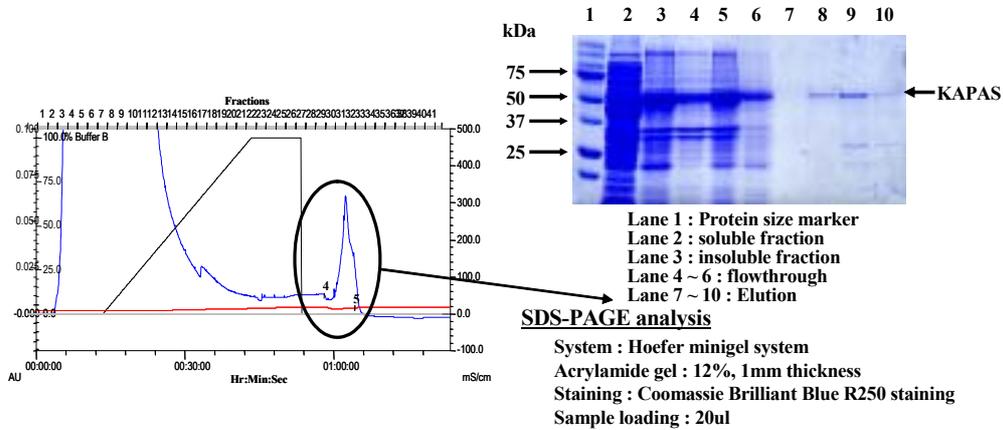


Fig. 3-2-16. Calmodulin affinity resin-soluble fraction.

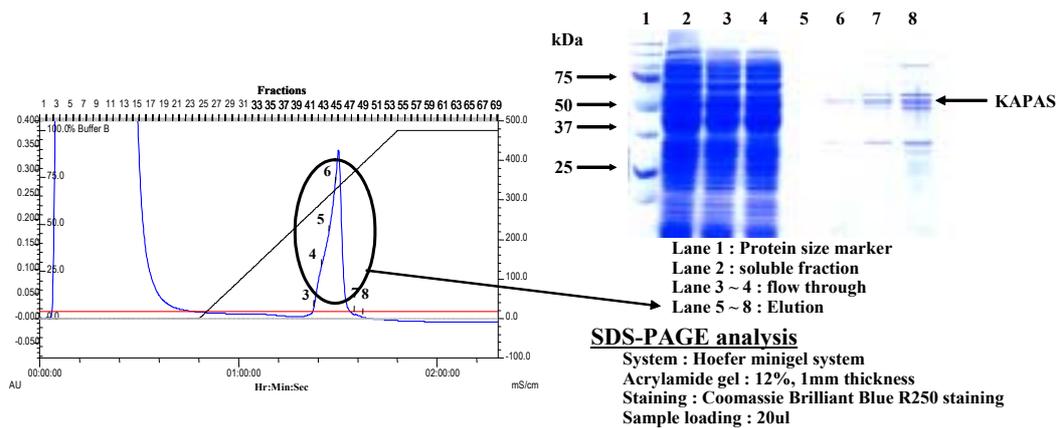


Fig. 3-2-17. Calmodulin affinity resin-insoluble fraction.

Construction of MBP fusion vector: Maltose binding protein(MBP) oligomer로서 NK-Nde I: 5'-AGC ATA **CAT ATG** AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG GTA-3'과 CK-EcoR I: 5'- ATA AGT **GAA TTC** AGT CTG CGC GTC TTT CAG GGC TT-3'를 제작하였고, KAPAS (K) oligomer로서 NK-EcoR I: 5' - CAA AAA **gAA TTC gAC gAC gAC gAC**

AAg ATg gCg gAT CAT TCg Tgg gAT AAA - 3'과 CK-*Xho* I: 5' - gTg CAC **CTC gAg** TTA TAA TTT ggg AAA Tag AAA ggA - 3'을 제작하여 PCR을 통해 pBluescript으로 subcloning 한 후 sequencing, 제한효소 *EcoR* I와 *Xho* I을 이용하여 AtKAPAS cDNA의 full-length를 확인하였으며, PCR을 통하여 AtKAPAS의 모든 염기서열을 코드화 하였다. PCR을 통하여 만들어진 조각들은 MBP fusion vecto에 접합시켜(Fig. 3-2-18) 삽입시킨 *E. coli*는 Luria broth media(200ml Erlenmeyer flasks)에 넣고 37°C, 200rpm, 18 hrs 동안 선 배양한 후 이를 다시 50mg의 ampicillin/ml을 첨가하여 37°C, 200rpm, OD₆₀₀ = 0.6까지 배양하였다. 이를 원심분리하여(4,000xg, 15min) 집균하고 1mM IPTG를 처리하여 37°C 200rpm에서 5시간동안 추가 배양하였다. 이를 6,800rpm에서 10분동안 원심분리하여 상정액을 제거하였다. 침전물은 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 용액으로 2회 세척한 후 6000 rpm, 10 min동안 원심분리하였다. 다시 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl용액으로 현탁시켰다. Sonicator로 세포를 파괴시킨 후 1,200 rpm, 30 min동안 원심분리하여 상정액과 침전물을 전기영동하였다(Fig. 3-2-19). 그 결과 total fraction에 존재하였던 MBPek-KAPAS band가 lane 4,7의 soluble fraction으로 대량 이동하는 것을 알 수 있었다. 이때의 상정액을 column chromatography를 통해서 분석하였다(Fig. 3-2-20, 3-2-21).

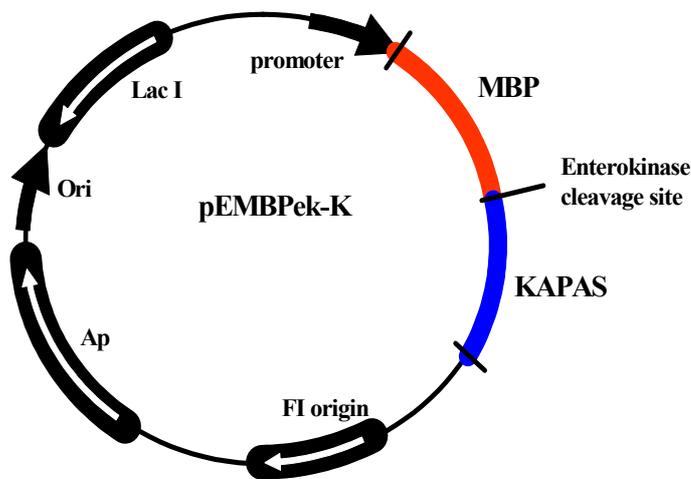


Fig. 3-2-18. Construction of MBP fusion vector.

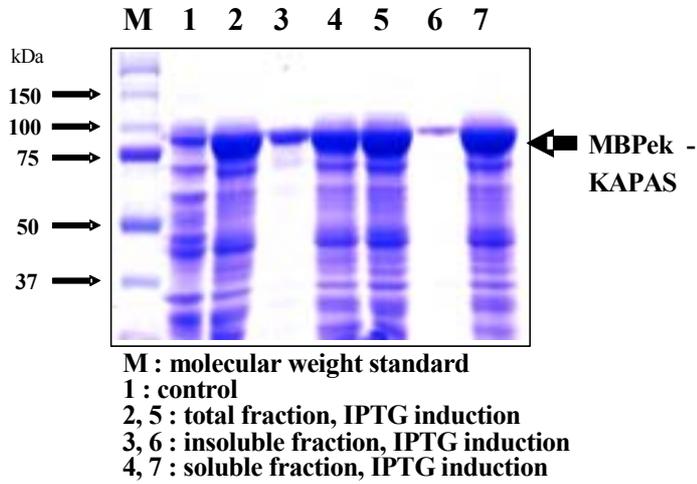


Fig. 3-2-19. Expression analysis of MBPek-KAPAS.

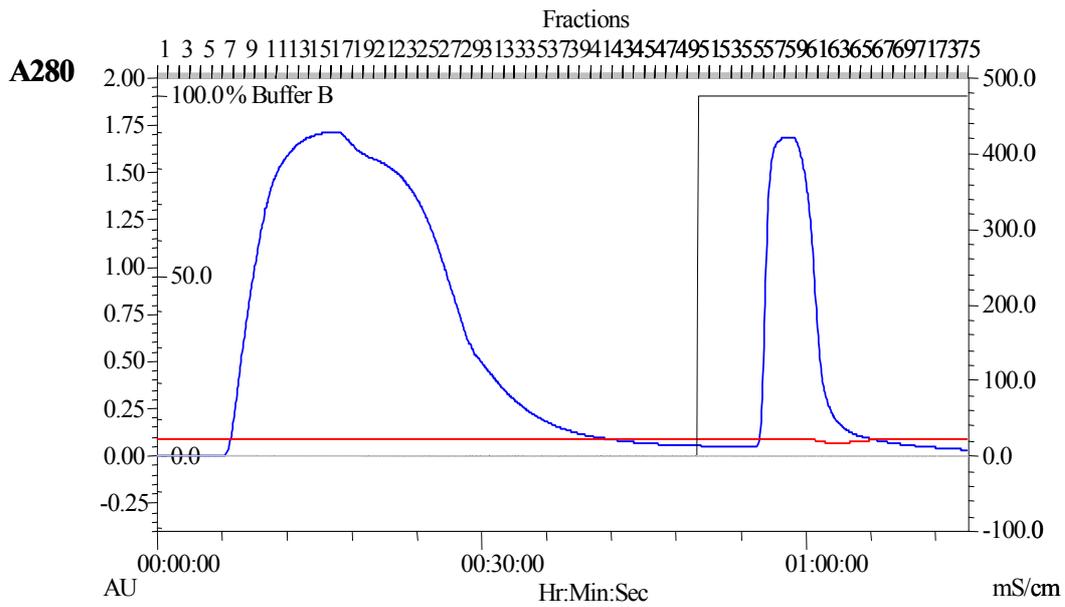


Fig. 3-2-20. Column chromatography and electrophoresis of MBPek-KAPAS.

Column chromatography 조건은 다음과 같았다.

System : Bio-rad HR system, Column : 1.1 cm X 30 cm (Millipore, USA), Resin : MBP Excellose (Bioprogen, Korea), Bed volume : 10 ml, Binding buffer : PBS (pH 7.4), Elution buffer : PBS (pH 7.4) + 10 mM maltose, Flow rate : 1 ml/min, Sample : 20 ml of soluble fraction MBPek-KAPAS 등이었다. 결과적으로 MBP fusion vector로 pCal-n vector를 바꾸어 준 결과 KAPAS의 용해도를 크게 증대시켰고(Fig. 3-2-21), 대량으로 추출한 효소를 이용하여 enzyme kinetics를 작성하였다(Fig. 3-2-22). 이를 이용해서 고속약효검색체계를 구축할 수 있게 되었고, 한국화학연구원 화합물은행의 대표 화합물 10,000개를 대상으로 hit를 탐색하였다. KAPAS에 대한 고속약효검색체계가 구축되기 전부터 BASF에서 관심을 가지고 연락이 왔다. 다음 내용은 그동안 주고받은 e-mail내용으로 아직까지는 계약을 체결하지 않았지만 다소간의 가능성을 보여주고 있다.

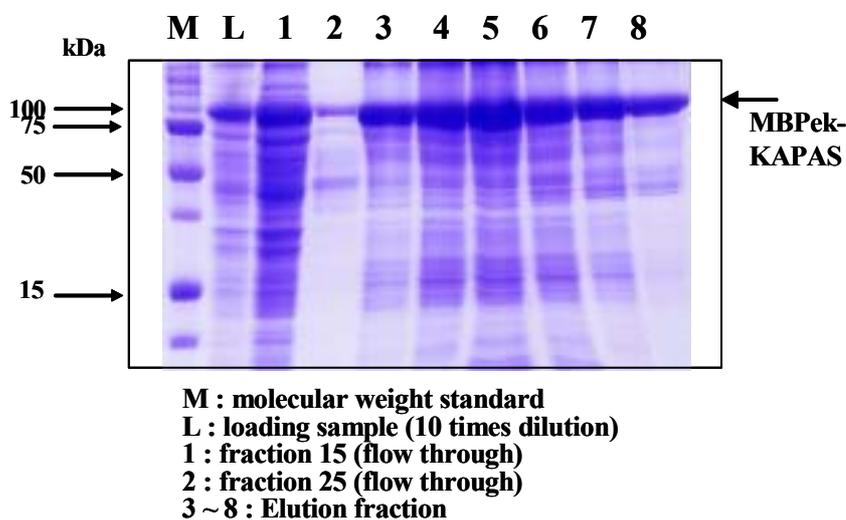
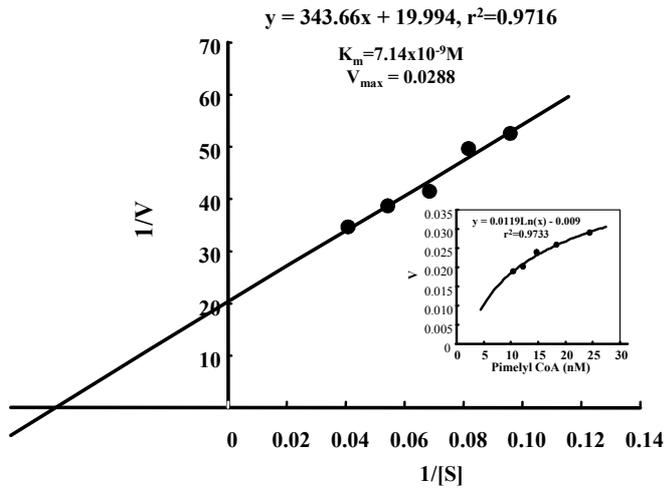


Fig. 3-2-21. Column chromatography and electrophoresis of MBPek-KAPAS.



Reaction mixture
 20mM P-phosphate, pH 7.5
 4 mM alphaketoglutarate
 1 mM thiamin pyrophosphate
 4 mM NAD⁺
 12 mM MgCl₂
 20 mM L-alanine
 100μM pyridoxal-5'- phosphate
 0.01 units α-ketoglutarate dehydrogenase

Pimelyl CoA: 32.5 μM
 KAPAS: Protein 3.04mg/mL

Fig. 3-2-22. Enzyme kinetics of MBPek-KAPAS.

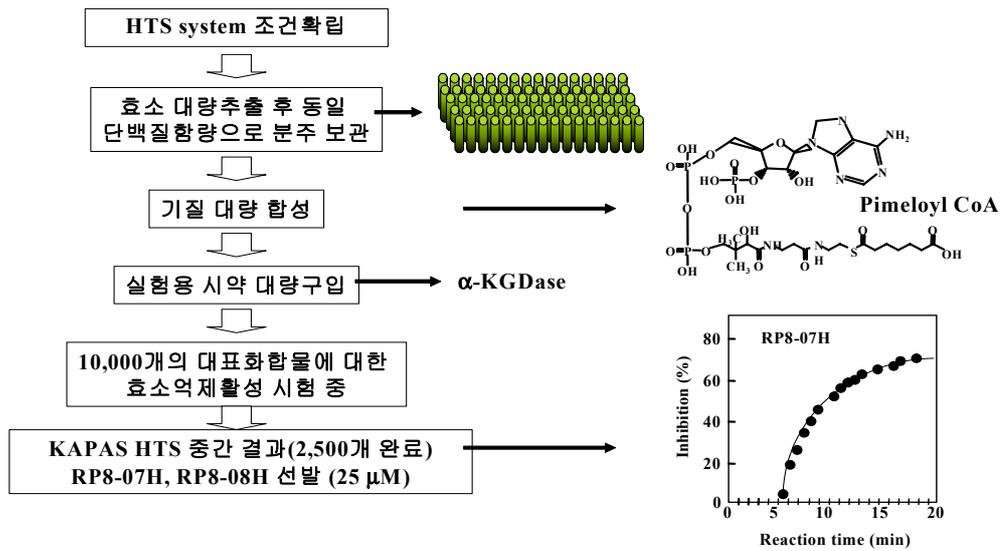


Fig. 3-2-23. HTS system for KAPAS inhibitors from Chemical Bank in KRICT.

<Letters between Hwang and Andreas Reindl in BASF>

2003. 3. 31 APWSS oral presentation. - Andreas Reindl
2003. 4. 1 I would initiate communication to BASF research people on your subject. From S.D. Song
2003. 4. 3 If you or BASF have interest on my study, please keep in touch with me. We can join together to develop new herbicide available for BASF interest.
2003. 9. 12 I recently received information about your presentation on *AtKAPAS* from Mr. Song. It seems interesting to me, so I would like to ask you for more details. From Andreas Reindl, BASF Aktiengesellschaft Global Research Agricultural Products.
2003. 9. 12 I will ask some of my 11 questions. - Andreas Reindl
2003. 9. 18 These are the answers on your questions. - Hwang
2003. 9. 28 Thank you, I have received your message. I will contact you later, as soon as we have discussed KAPAS. - Andreas Reindl
2003. 10. 6 As promised I have discussed your target together with our experts. In total, we are very interested about your work. So, I hereby write you some more questions which are very important for us to know. - Andreas Reindl
2003. 10. 17 These are the answers on your questions. - Hwang
2003. 10. 28 Thank you again for your information. We are still very interested in testing app. 10 compounds for KAPAS. What would be the financial and legal conditions for this? Please keep me informed, when you will be able to harvest enough protein for testing. All other details can be discussed then. - Andreas Reindl
2003. 10. 28 I promise you that I will send information and discuss more detail when I can harvest enough protein for the test. We can provide enough enzyme and purified substrate for candidate 2. However, we are preparing patents for these candidates. After patents application, I will send answers on your questions. I will keep in touch with you and hope to work together.- Hwang
2004. 5. 17 Thank you so much for you response and your offer to measure some compounds free of charge. This is important to us since we can then get a feeling about the

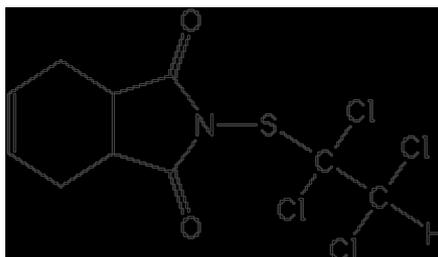
data you produce. This will be a much better foundation to afterwards discuss the testing of more compounds. My question is, could you please determine the IC_{50} of 15 compounds we are currently preparing for testing. It would be extremely difficult to select 10 of those, because we have no knowledge on selection criteria. If you agree, we would send you in some time the compounds, together with our standard material transfer agreement (which protects the compounds). I will inform you as soon as we have finished synthesis. - Andreas Reindl

2004. 5. 22 If you send 15 compounds and standard, we can test and check IC_{50} with charge free. Let me know what is difficult problem for your selection 10 among 15 compounds.

KAPAS 저해 hit 발굴: 한국화학연구원 화합물은행의 10,000개 화합물과, 구매를 통하여 확보한 식물특이적 효소저해 물질 (Biochemical Reagents) 107 약제, 제조제 원제 55 약제, 살균제 원제 173 약제 등을 대상으로 hit를 발굴한 결과 phthalimid계(Fig. 3-2-24), phenylsulfamide계(Fig. 3-2-25), quinone계(Fig. 3-2-26)를 발굴하였고 이들에 대한 유도체 합성화합물 A 100 약제 (K-series), 합성화합물 17 약제 (KO-series), 합성화합물 C 5 약제 (EK-series)를 합성하였다. 이들 중 대표적으로 phthalimid계 120약제의 합성 과정을 간략하게 도식화 하였다(Fig. 3-2-27). 합성한 phthalimid 유도체들의 KAPAS저해 활성을 비교한 결과(Table 3-2-1) K-65, K-69, K-73에서 가장 강한 활성을 보여 온실시험으로 확인하도록 하였다. 또한 선발된 hit들에 대해서는 계속적으로 유도체를 합성하여 온실에서 검토할 예정이다. 온실시험에서 선발된 후보화합물들에 대해서는 포장시험을 통하여 개발가능성을 검토할 예정이다.

Phthalimide fungicides

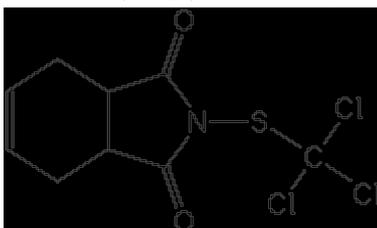
Captafol
(64%)



IC₅₀=56.2μM

N-(1,1,2,2-tetrachloroethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide

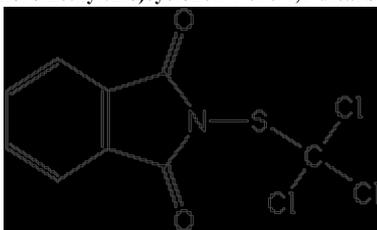
Captan
(56%)



IC₅₀=54.1μM

N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide

Folpet
(32%)

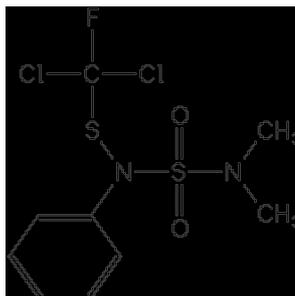


N-(trichloromethanesulfonyl)phthalimide

Fig. 3-2-24. IC₅₀ and structures of KAPAS inhibitors among fungicides.

Phenylsulfamide fungicides

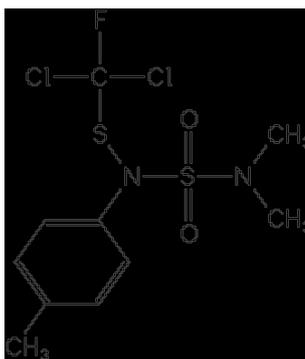
Dichlofluamid
(69%)



IC₅₀=40.9μM

N-dichlorofluoromethylthio-*N,N'*-dimethyl-*N*-phenylsulfamide

Tolyfluamid
(65%)



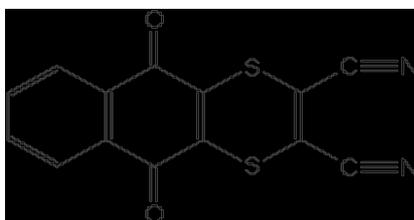
IC₅₀=47.1μM

N-dichlorofluoromethylthio-*N,N'*-dimethyl-*N-p*-tolylsulfamide

Fig. 3-2-25. IC₅₀ and structures of KAPAS inhibitors among fungicides.

Quinone fungicides

Dithianon
(57%)



IC₅₀=11.1μM

5,10-dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-*b*]-1,4-dithi-in-2,3-dicarbonitrile

Fig. 3-2-26. IC₅₀ and structures of KAPAS inhibitors among fungicides.

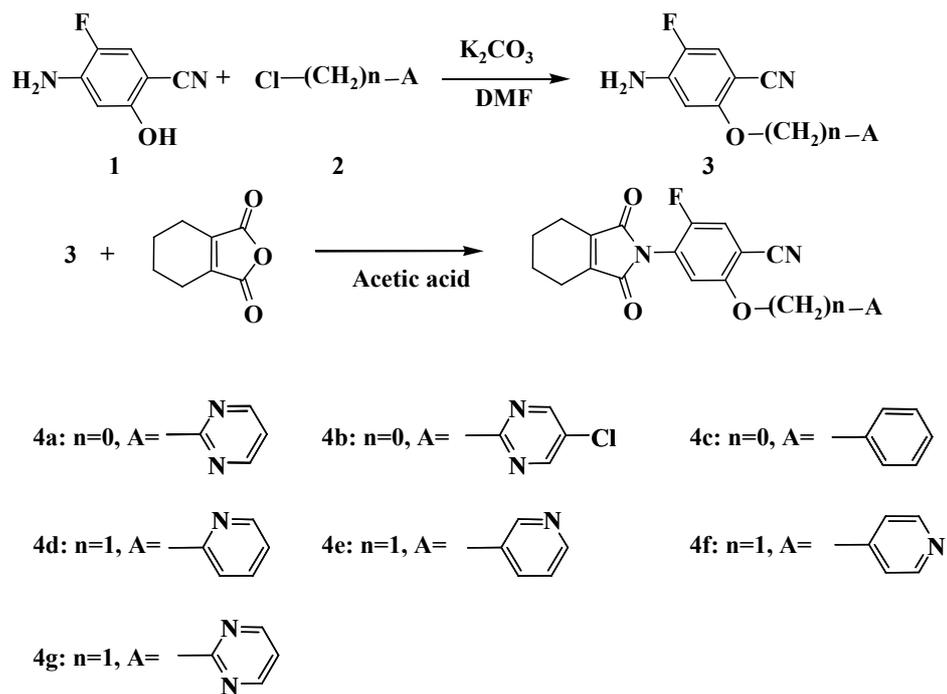


Fig. 3-2-27. Synthesis of phthalimide derivatives for KAPAS inhibiting candidates.

Table. 3-2-1. IC₅₀ of phthalimide derivatives to KAPAS activity.

Compound	IC ₅₀ (mM)						
K-1	0.42	K-31	-	K-61	0.74	K-91	-
K-2	2.37	K-32	0.76	K-62	-	K-92	-
K-3	1.31	K-33	0.86	K-63	0.58	K-93	-
K-4	-	K-34	-	K-64	-	K-94	-
K-5	-	K-35	1.01	K-65	0.13	K-95	-
K-6	-	K-36	1.27	K-66	0.89	K-96	-
K-7	0.86	K-37	-	K-67	0.44	K-97	-
K-8	-	K-38	1.22	K-68	0.51	K-98	-
K-9	1.94	K-39	-	K-69	0.36	K-99	1.25
K-10	0.59	K-40	-	K-70	0.50	K-100	0.72
K-11	1.62	K-41	0.78	K-71	1.08	K-101	1.04
K-12	-	K-42	-	K-72	-	K-102	1.16
K-13	1.69	K-43	0.76	K-73	0.30	K-103	0.50
K-14	1.24	K-44	-	K-74	0.61	K-104	-
K-15	-	K-45	-	K-75	-	K-105	0.85
K-16	1.24	K-46	0.97	K-76	-	K-106	1.29
K-17	1.54	K-47	1.19	K-77	-	K-107	0.71
K-18	2.87	K-48	0.92	K-78	-	K-108	0.98
K-19	-	K-49	-	K-79	-	K-109	0.70
K-20	1.47	K-50	1.85	K-80	-	K-110	0.86
K-21	1.26	K-51	-	K-81	-	K-111	1.38
K-22	-	K-52	-	K-82	0.98	K-112	-
K-23	1.56	K-53	1.28	K-83	-	K-113	-
K-24	1.29	K-54	2.03	K-84	1.05	K-114	-
K-25	0.67	K-55	-	K-85	-	K-115	0.49
K-26	-	K-56	-	K-86	-	K-116	0.75
K-27	1.13	K-57	1.13	K-87	-	K-117	-
K-28	-	K-58	0.76	K-88	-	K-118	-
K-29	0.97	K-59	1.47	K-89	-	K-119	-
K-30	-	K-60	0.67	K-90	-	K-120	-

제 3절 Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase(CAD) 연구

1. 서론

Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase(CAD, EC 1.1.1.195)는 lignin 생합성에 관여하는 효소로서, 식물체에서 lignin은 phenolic polymer들의 복합체의 하나로 세포벽을 튼튼하게 하여 식물체를 강건하게 하고, 수분의 침투와 용탈을 방어하는 기능을 가진다. 따라서 lignin은 식물체가 넘어지지 않게 지지해주는 구실과 영양분 등과 같은 용질의 이동과 질병에 대한 내성을 유지시켜준다. 따라서 식물체의 lignin 생합성 과정을 저해하는 화학물질을 처리하게 되면 세포의 괴사, 세포벽의 파괴, 상처의 치유불능 등으로 인하여 식물이 고사하게 된다. 한편, lignin의 성분변화를 통하여 식물의 품질개선, 병저항성 등은 물론 아직까지 밝혀지지 않은 조절기능 등의 큰 잠재력을 가지고 있는 대사과정이다. 특히 antisense 기법으로 CAD를 결손시킨 식물체의 phenotype을 확인한 바에 의하면 아주 심한 성장저해를 일으켜 신규 제조체의 작용점으로 확정하였고, 아직까지 CAD 저해제가 보고 되지 않았기 때문에 신규 작용점으로서의 특허는 물론 저해제로서의 특허를 취득함은 물론 신규 제조체 개발가능성이 매우 높다. 즉, Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD)는 생체 내에 3종류가 존재하며, 그중 본 연구의 대상은 기질 coniferaldehyde를 coniferyl alcohol로 전환시키는 coniferyl alcohol dehydrogenase이다. 기질로 사용되는 *p*-coumaraldehyde, coniferaldehyde, sinapaldehyde 등은 lignin을 구성하는 monomer들이다. lignin은 식물에만 존재하는 세포벽의 구성물로 cellulose는 기둥이 되고, hemicellulose는 철망이 되고, lignin이 그 사이사이에 이들을 하나로 만들어주는 matrix로서 식물체를 지지하는 중요한 역할을 한다(Fig. 3-3-1). 따라서 리그닌이 만들어지지 않는다면 세포가 완성되지 않기 때문에 성장을 하지 못하거나 죽게 될 것이다. 식물체에서 lignin을 생합성하는 기작은 그림 3-3-2와 같다. 1차 년도에 구축한 고속약효검색체계를 이용하여 한국화학연구원 화합물은행의 35,000개 화합물에 대한 CAD 저해활성을 조사하였다. CAD는 정반응을 통하여 lignin을 합성하기도 하고, 역반응을 통하여 lignin의 생성량을 조절하기도 한다. 먼저 형질전환 *E. coli*로부터 AtCAD protein의 최적 발현조건으로부터 정제과정의 대부분은 AtKAPAS를 위한 실험과정과 동일하게 하였다. 고속약효검색체계는 Mitchell 등의 방법에 준하여 화합물의 CAD 저해활성을 측정하는 것으로 효율은 한 사람이 하루에 약 1,000화합물을 검정할 수 있다. 이렇게 확보된 효소를 이용하여 96-well 고속약효검색체계를 이용하여 한국화학연구원 화합물은행에 보관되어 있는

60,000개 화합물 중 45,000개의 화합물의 CAD의 정반응 및 역반응에 대한 활성을 조사하였다. 1차적으로 정반응에 대해서 가장 효과가 높았던 10개의 화합물을 hit로 선발하였고, 이들에 대한 *in vivo* test를 온실 및 포장시험으로 수행하였다.

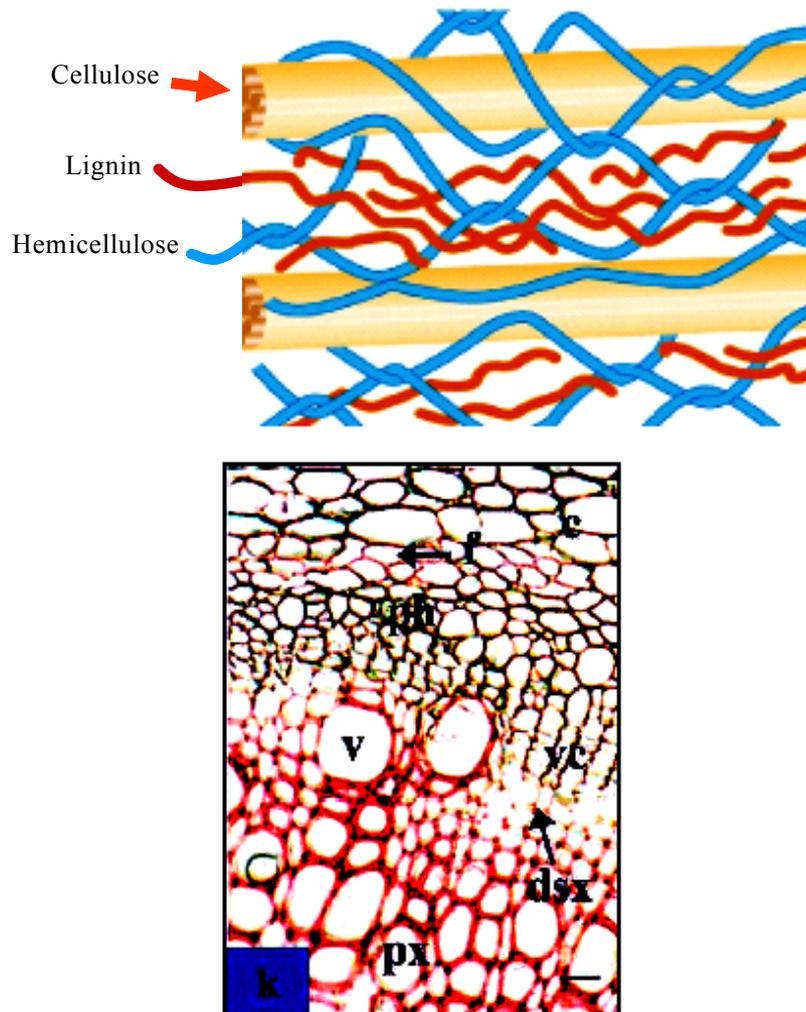


Fig. 3-3-1. Schematic representation of the lignified secondary wall.

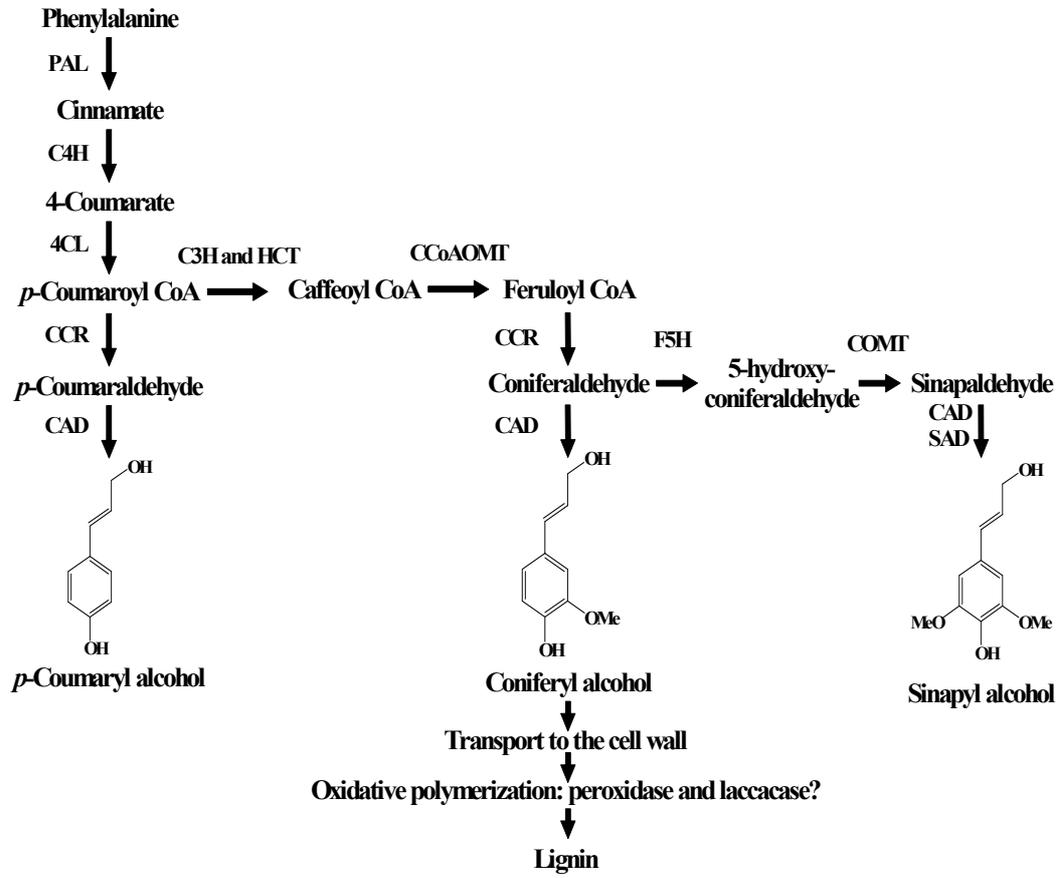


Fig. 3-3-2. Lignin biosynthetic pathway in *Angiosperms*.

2. 재료 및 방법

가. Antisense 기법을 이용한 작용점 확인

Arabidopsis thaliana의 재배: *Arabidopsis thaliana*(Colombia) 표준형과 형질 전환 식물체는 22°C의 growth chamber(16h-light/8h-dark)에서 토양을 담은 포트 또는 1/2세기의 Murashige and Skoog(MS) 배지(Sigma, St. Louis, Mo., USA)에 2% (W/V) sucrose, pH 5.7, 0.8%(W/V) agar를 용해시킨 Petri-dish에서 생육시켰다. 포트에서 재배할 때는 22°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 growth chambers 내에서 수행하였다.

DNA와 RNA 조작 및 분석: 식물체 DNA와 플라스미드 DNA를 단리 시키고, 국부적 분리, 변조, ligation, polymerase chain reaction(PCR), agarose와 polyacrylamide gel을 이용한 전기영동, 형질전환 *E. coli* 및 *Agrobacterium*의 제작 및 배양, DNA gel blot 분석(Southern, 1975) 등은 Sambrook et al.(1989)의 표준방법을 약간 변형시켜 수행하였다(Fig. 3-3-3, 3-3-4, 3-3-5). RNA gel blot(northern) 분석은 다음과 같이 수행하였다. 10 μ g의 RNA를 변성시키고, 1.2% form aldehyde-agarose gels를 이용하여 크기별로 분획하여 nylon membranes(ICN, Costa Mesa, Calif., USA)에 올려놓았다. 이를 hybridization시키고 부착되지 않은 DNA 조각들은 Oh et al.(1996)의 방법에 준하여 세척하였다.

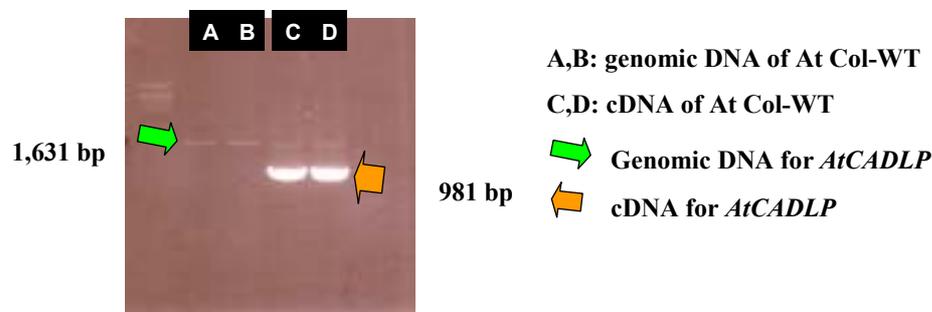


Fig. 3-3-3. AtCADLP ORF isolation from cDNA through PCR amplification.

cDNA library construction: *A. thaliana*의 잎으로부터 얻은 모든 RNA를 poly(A)⁺RNA로 제작하였다. 5 μ g의 poly(A)⁺RNA와 primer로 *NotI*-(dT)18를 사용하여 Time Saver cDNA synthesis kit(Pharmacia, Piscataway, N.J., USA)에서 2중나선의

cDNA를 합성 제작하였다.

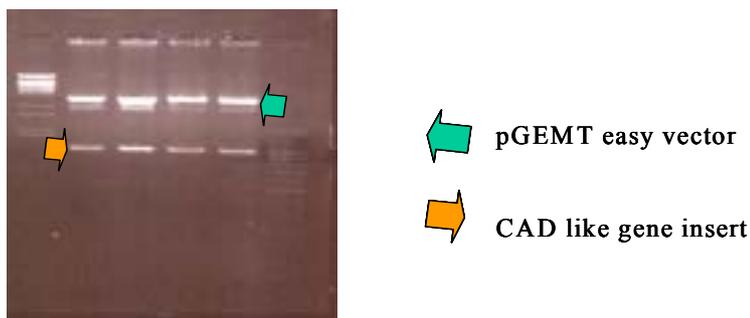


Fig. 3-3-4. Subcloning of AtCADLP into T-easy vector & seq. request.

```

                                atggca      gene 6556429..6558283
6556501. aacagtggtg aaggtaaagt ggtgtgtgta acaggagcct cgggttaact cgcctcatgg /gene="At5g19440"
6556561. ctogtcaagt toctacttag cgtgggtac actgttaagg cctcogtcoy tgatccccgt /note="synonym F7K24.190, cinnamylalcohol
6556621. tcogtacocct ctctctctcta tcacatttoat ttgcttttagg gtccatatac taittccaaatt Dehydrogenase, apple tree,
6556681. aagtctgtgt tactgtagtt taagatttgg gttctctactg gtaaaactctg tgtgcttggga PIRT16995;supported by full-length
6556741. toctgattct atttagtgaat cgaaggctac abcttaaaaa ctgatacttt gpaattggat cDNA: Ceres:6748."
6556801. accaattttg abcttaagaa caatctaaac acacaacaaa tgatcctttg atgttcttbtg
6556861. ctctgcttbt acacaggtga tccgaaaag acacaacact tagtttccact agaagggtgca mRNA
6556921. aaggaaagac ttcactttgt caaagcagac ctitttggaac aaggttcttt cgactctgct join(6556429..6556618,6556877..6557
6556981. aittgagttt gccatggagt tttccaaact gcttctccat tttttaatga tgcocaaagac 046,6557127..6557318,
6557041. cocaggtttt ggttttttat tccctaaaa aattgctttt taittttggg aittgatttga 6557446..6557608,6557718..6557904,6
6557101. tcttaactat gtatccaat ctccaggtg aacttattga toctgoggtc aaggggaocg 557981..6558283)
6557161. ttaacgtttt gaattctgtc gccaaagcct cttogggtta gagggttgtt gtaacctcct /gene="At5g19440"
6557221. ccattggctgc cgttgggtac aatggaaaac caogcaacc tgatgttaoc gtcgatgaaa /note="protein id: At5g19440.1,
6557281. cttggtcttc tgatoottag ctttgogagg cctccaaagt gctgtttttaa taittgagoc supported by cDNA: 6748."
6557341. tgattcaatt cgattatbtt gttgtcaibct actagcaact agtctgtctta ttgtgtgtga /transcript_id="NM_121949.1"
6557401. atgttctctt caaactaaaa tgttatgtct tgttacttgg ctcagatgtg gtagtctcta /db_xref="GI:18419916"
6557461. tocaagactt tggoggaaga tgcagcttgg aaactcgcta aagagaaagg ctttagaact
6557521. gttactatta accoggctat ggtgatoggt cctctctac agcacaactct gaacacgagt
6557581. gctgtgtgta taittaactt aatcaatggt aagagaaaa cttttacttc tttcatgata CDS
6557641. cttaggaocg gtttgtcaaa tgctagctag agaaacctt tcaacttgg tgtcttttat join(6556495..6556618,6556877..65570
6557701. ttatttccga tatgtagggt caaagacttt ccaaaacttg agtttcggat gggttaatgt 46,6557127..6557318,
6557761. aaaagaogta gccaatgoc acatccaaagc atttgaggtc ccttcagcta atgggogtta 6557446..6557608,6557718..6557904,6
6557821. ttgttttggtc gagcgtgtcg ttcaccactc cgagattgtt aacattctac gtcgatctta 557981..6558125)
6557881. cccaaatctc ccaactaact aaaggtaaaa catgaactaa atataattaca cgggttgttt /gene="At5g19440"
6557941. tgttcatgtc ctgtgtcaat aacttttgc tcaatcgcag gtcgtgtgac gagaatccct /Codon_start=1
6558001. acgtgcaac gtatcaagtg tcaaggata aaacggagg ccttggtata gactacatac /protein_id="P_197445.1"
6558061. ccttgaaggc tagcatcaag gagaocgtcg agtctttaa ggaaaaaggc ttogcaocgt /db_xref="GI:15239741"
6558121. tctga

```

Fig. 3-3-5. The nucleotide sequence of cinamyl-alcohol dehydrogenase-like protein gene.

형질전환 *E. coli*로부터 AtCAD protein의 발현: Primer로 CADLP (5'-AAG GATCCATGGCAAACAGTGGTGAAGGTAAAGTG-3')와 CADLP(5'-CGAAGCTTTTCAG AACTGTGCGAAACCTTTTTCCTT-3')를 합성한 후 *Bam*H1와 *Hind*III를 이용하여 *AtCAD* cDNA의 full-length를 확인하였으며, PCR을 통하여 *AtCAD*의 모든 염기서열을 코드화 하였다(Fig. 3-3-6, 3-3-7, 3-3-8). PCR을 통하여 만들어진 조각들은 pCAL-n vector (Stratagene)에 접합시켜 pCCAD를 제작하였다. pCCDA vector를 삽입시킨 *E. coli*는 Luria broth media(200 ml Erlenmeyer flasks)에 넣고 100µg의 ampicillin/ml을 첨가하여 37°C에서 A₆₀₀=1.0까지 배양시켰다. 이를 원심분리하여 (4,000xg, 15min) 집균하고 1mM IPTG를 처리하여 2시간동안 동일한 조건에서 추가 배양하였다. 이를 원심분리하여(4,000xg, 15min) 집균하고 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 50mM MgSO₄ and 0.4M NaCl)으로 세척한 후 원심분리하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

Cloning of *AtCADLP* into pCALn vector for gene expression

- 1) Digestion of pCALn vector and *AtCADLP* with various restriction enzymes (*Bam*H1-*Hind*III)
- 2) Elution of the digested pCAL vector and *AtCADLP*
- 3) Gel extraction of digested pCAL vector and *AtCADLP* using QiaexII
- 4) Ligation of pCALn vector and *AtCADLP*
- 5) Transformation into the *E. Coli* Top10 strain & confirm of transformants
- 6) Transformation into protein expression strain such as BL21-Gold (DE3)

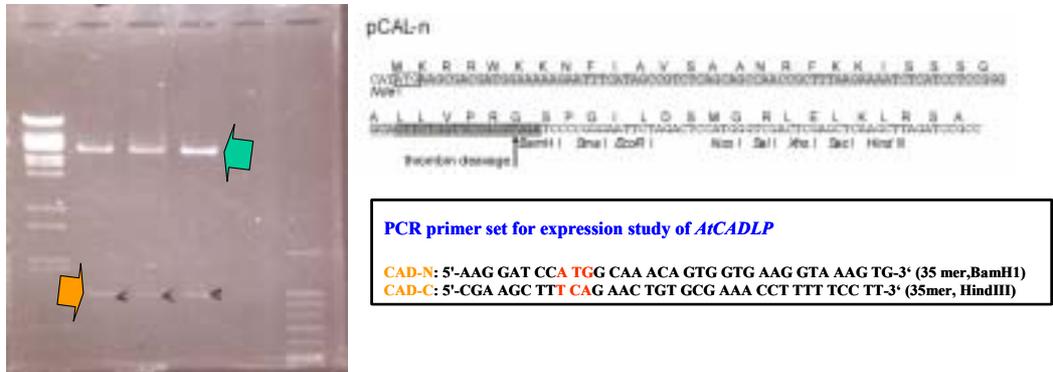


Fig. 3-3-6. Digestion of pCALn vector and *AtCADLP* with *Bam*H1 and *Hind*III.

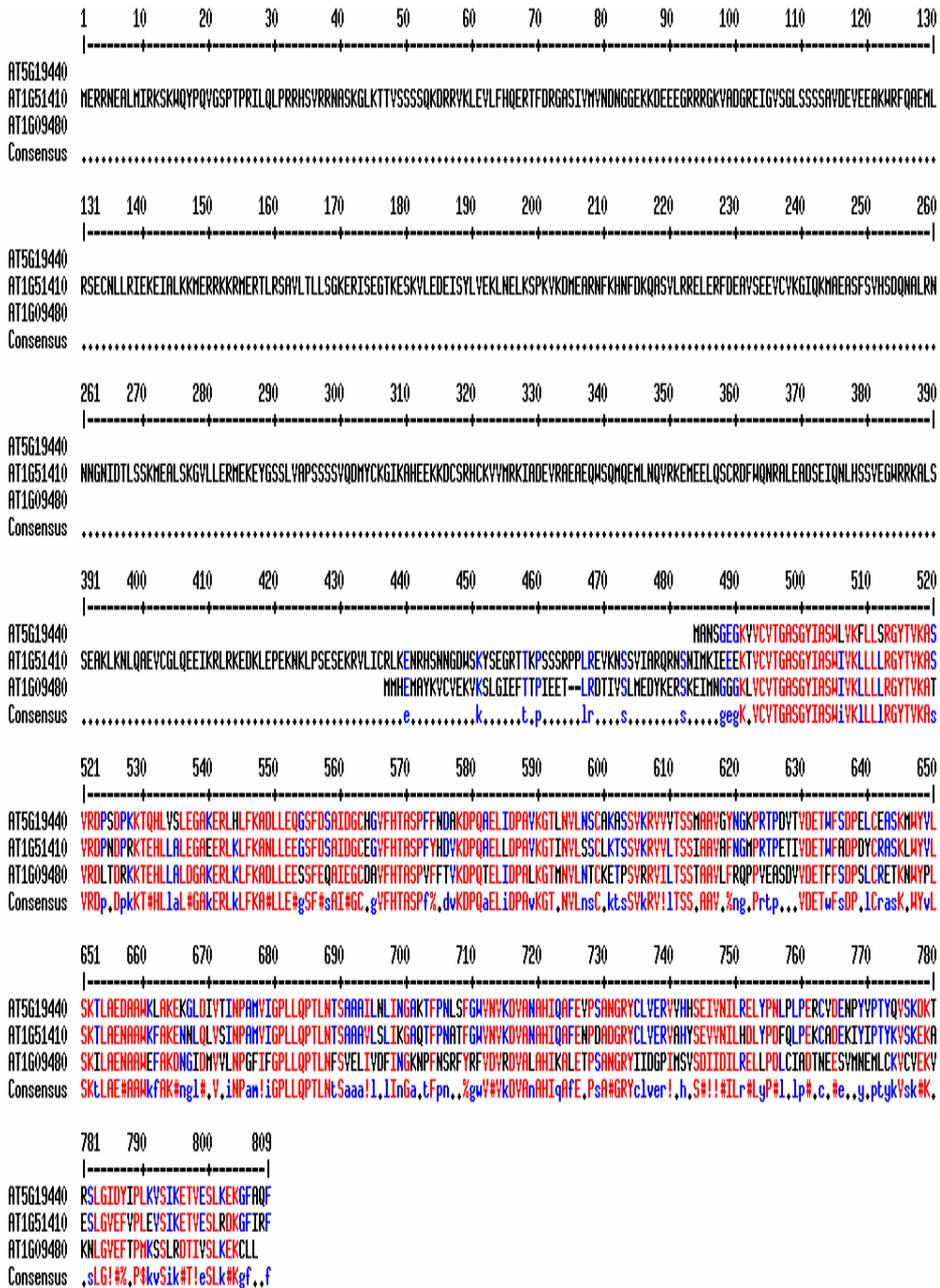


Fig. 3-3-8. Multiple alignment of AtCAD (II)

Antisense AtCAD construct 제작 및 *Arabidopsis thaliana*로의 형질전환:
 AtCAD의 DNA full-length를 얻기 위하여 KAPAF(5' GCAGATCTTCGCCCAAATC ACAATTC 3')와 KAPAR(5' GCAGATCTTTCACTGACAATATCAGAAACAA 3')를 합성하였다. PCR을 통하여 만들어진 산물에 *Bgl*III으로 digestion한 후 pCSEN vector에 삽입하였다(Fig. 9). 이로서 반대방향으로 정렬된 pCSEN-K을 강력한 비특이성 promotor SEN1을 cauliflower mosaic virus 35S promoter 대신 사용하여 만들었다. 이를 *Arabidopsis*에 전이시키기 위한 *Agrobacterium*은 28°C에서 0.8-1.0의 OD₆₀₀ 까지 배양한 후 25°C, 5,000rpm에서 10분 동안 원심분리(Sorvall RC5C; DuPont, Wilmington, Del., USA)하였다. Bacteria pellet은 Infiltration Medium(IM=1 MS salts, 1 B₅ vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77)에 현탁시켜 최종적으로 OD₆₀₀값 2.0-2.4 까지 배양하였다. 4주일동안 생육시킨 애기장대를 *Agrobacterium* 현탁액에 침지시킨 후 vacuum chamber에 넣고 10⁴Pa에서 10분 동안 침투시켰다. 이를 꺼내어 polyethylene foil로 24 h동안 두었다. 이후 계속적으로 성장시켜(T₁) 종자를 채종하였다. 이때 형질 전환시키지 않은 wild-type과 antisense AtCAD가 포함되지 않은 plasmid (pCSEN-K)만 전이시킨 것을 동일하게 재배 채종하였다.

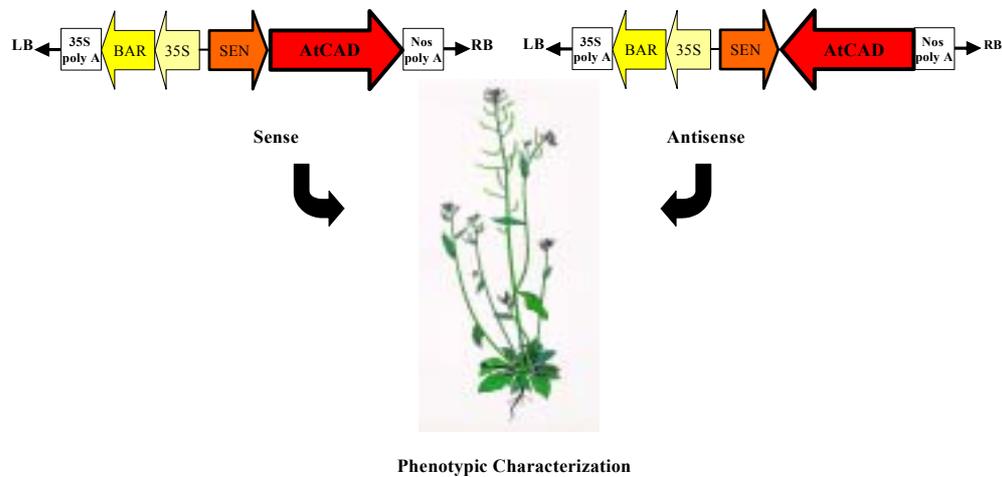


Fig. 3-3- 9. Sense and anti-sense expression of target gene in *Arabidopsis*.

Antisense AtCAD construct가 형질전환된 T₁ 애기장대의 lethality 확인: T₁ 애기장대의 종자를 0.1% Basta용액에 30분 동안(Saito et al., 1992) 침지시킨 후 5,000개의 형질전환종자를 5 μ M의 biotin을 첨가한 것과 첨가하지 않은 MS배지로 조성한 agar plate(Petri-dish)에 과종하였다. 한편 포트 시험에서는 모래배지에 종자를 과종하고 1mM biotin을 포함한 용액과 포함하지 않은 용액을 매일 공급하면서 재배하였다(Schneider et al., 1989). 5000개의 종자로부터 basta 처리에 의해 선발된 식물체 중에서 고사개체를 조사하여 치사율로 환산하였다.

나. AtCAD의 정제 및 효소활성 측정

형질전환 *E. coli*로부터 AtCAD protein의 정제: 형질전환 *E. coli*로부터 AtCAD protein의 최적 발현조건으로부터 정제과정의 대부분은 AtKAPAS를 위한 실험과정과 동일하게 하였다. 즉, -70°C에 보관중인 AtCAD 형질전환 대장균을 ampicillin이 100 μ g/ml 포함된 LB배지 plate에 streak하여 37°C에서 24시간 배양하였다. Single colony를 취하여 ampicillin이 100 μ g/ml 포함된 Luria-Bertani(LB) 액체배지로 옮겨 O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 될 때까지 37°C에서 250rpm으로 교반 배양하였다. AtCAD의 대장균 세포내 대량발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG를 최종 농도 1mM이 되도록 첨가한 후에 37°C에서 2시간 더 배양하였다. AtCAD의 발현 여부는 SDS-PAGE electrophoresis를 통하여 확인하였다(Fig. 3-3-10). 배양한 transgenic *E. coli*를 원심분리(4,000xg, 15 min)하여 집균하고 30ml CaCl₂ binding buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol, 1.0mM magnesium acetate, 1.0mM imidazole, 2mM CaCl₂)에 pellet을 현탁 시켰다. 여기에 lysozyme(200 μ g/ml)을 첨가시키고 15분 동안 교반 하였다. 이를 Ice bath에 옮기고 30초씩 5회 sonicator로 세포를 파괴시켰다. 원심분리(10000xg, 15min)로 침전시킨 후 상정액을 calmodulin affinity resin이 충전된 column으로 옮기고 4°C, 8시간동안 서서히 흔들어주었다. CaCl₂ binding buffer(50ml)를 흘려주면서 calmodulin affinity resin에 부착되지 않은 기타 단백질들과 찌꺼기를 모두 씻어주었다. 마지막으로 calmodulin affinity resin에 부착된 효소는 elution buffer로 집균하여 전기영동으로 확인하고 효소활성을 측정하였다.

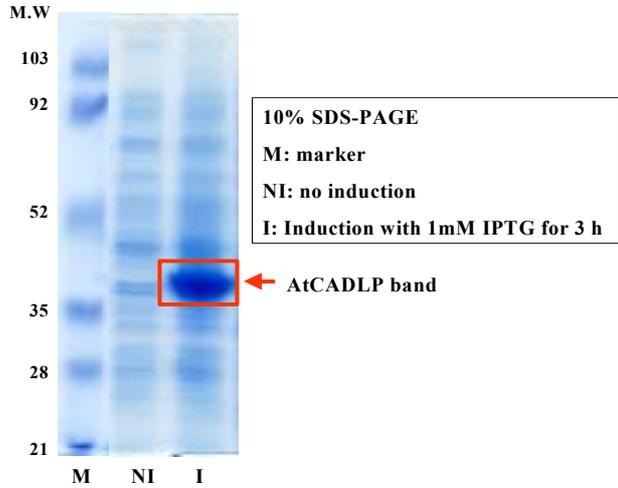


Fig. 3-3-10. SDS-PAGE for the confirm of AtCADLP expression in BL21.

최적 발현조건 확립: IPTG 처리시간에 따른 AtCAD의 발현은 정상적으로 이루어졌고, 특히 AtKAPAS에서와 같이 membrane bound형으로 존재하지 않고 용존 상태로 많은 양이 확보되었다. 이들을 calmodulin affinity column을 이용하여 분취한 결과 AtCAD를 제외한 기타 수용성 단백질이 깔끔하게 제거되는 것을 확인하였다(Fig. 3-3-11, 3-3-12).

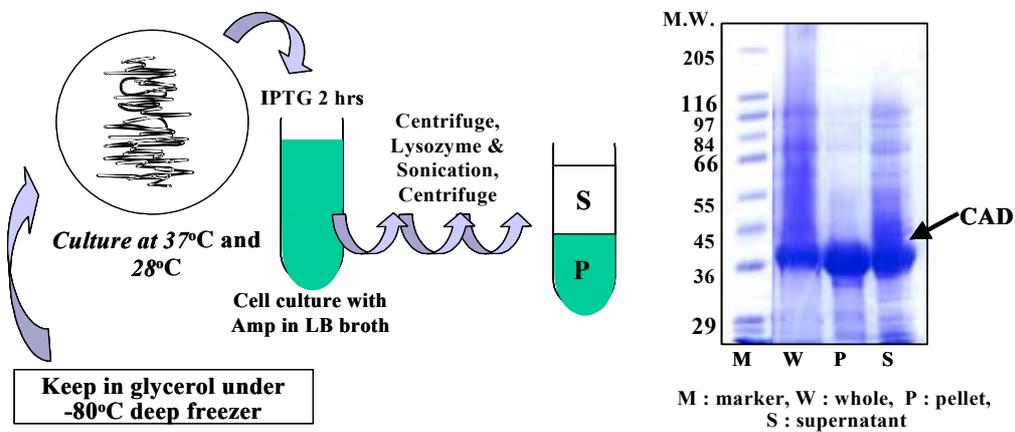


Fig. 3-3-11. Purification of cinnamylalcohol dehydrogenase from transgenic *E. coli*.

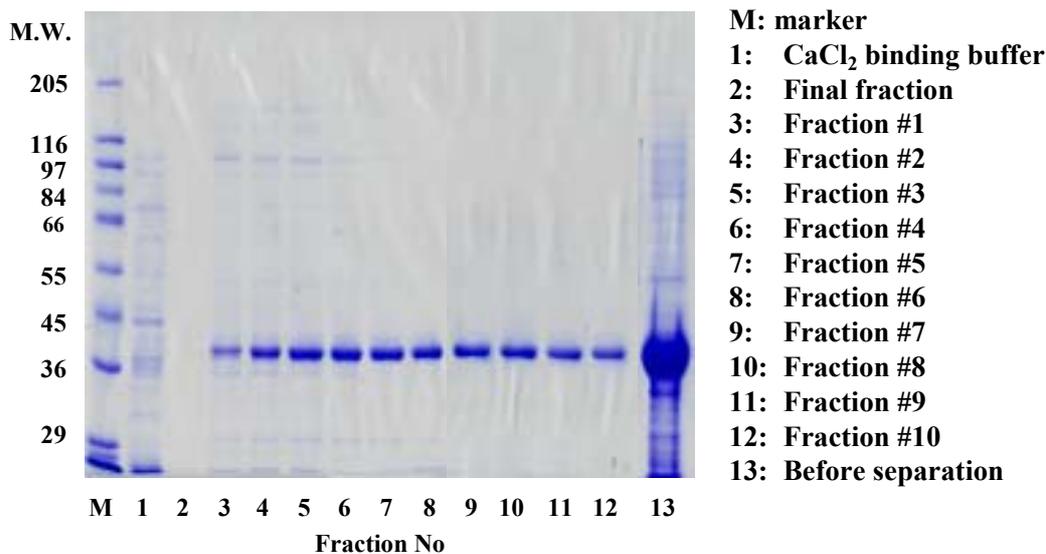


Fig. 3-3-12. Separation of cinnamylalcohol dehydrogenase from transgenic *E. coli*.

효소활성 측정방법 확립: 상기 분리된 단백질이 바이오틴 생합성에 관여하는 CAD 디하이드로게나제의 기능을 갖고 있는지 확인하기 위하여 코리페릴 알콜 (coniferyl alcohol)을 기질로 사용하여 효소 활성도를 측정하였고, 역반응의 기능을 갖고 있는지 확인하기 위하여 coniferyl aldehyde를 기질로 사용하여 효소 활성도를 측정하였다. 상기 단백질의 효소 활성도는 37°C로 조절되는 Microplate reader (Bio-rad Benchmak)를 사용하여 405nm에서 미첼(H.J. mitchell *et al.* Planta, 208:31-47, 1999)등의 방법에 의해 측정하였다. 효소의 정반응 활성 측정을 위한 반응액 200ml에는 100mM Tris-HCl(pH 9.3), 100mM NADP⁺, 정제된 단백질 2-3μg이 포함되어 있고, 효소의 역반응 활성 측정을 위한 반응액 200ml에는 100mM NADP⁺를 제하고 100mM NADPH가 포함되도록 하였고 그 외의 조건은 정반응과 같다. 기질 농도별 coniferyl alcohol 또는 역반응 기질 농도별 coniferyl aldehyde를 각 반응 용액에 첨가하여 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 대조군으로는 상기 정제된 단백질을 제외한 다른 성분들이 함유된 웰(well)을 사용하였다.

효소활성 저해 화학물질 탐색: 정제 및 효소활성을 특정할 수 있는 체제를

구축한 후 CAD에 대해서는 96-well을 사용하는 고속약효 검색체제로 전환시켰다. 구축된 고속약효검색체제(HTS)를 활용하여 한국화학연구원 화합물은행에서 보유하고 있는 45,000여 화합물, 식물특이적 효소저해제 100개, 살균제 원제 및 구입화합물 200개, phthalimide계 화합물 120개 등 약 46,000여 화합물을 100mM 농도로 처리하여 효소활성 억제정도를 측정하였다. 또한 신규 구입화합물을 대상으로 40mM로 처리한 후 80% 이상 억제하는 물질에 대해서는 농도확대시험을 통하여 IC₅₀값을 계산하였다.

HIT로부터 신규 유도체 합성: Benzoic acid 3-[2-(3,5-dichloro-phenyl)-1,3,3,3-tetrafluoropropenyloxy]-phenylester(KO-200978) 및 3-[2-(3,5-Dichloro-phenyl)-1,3,3,3-tetrafluoropropenyloxy]phenol 유도체를 합성하였다. 합성방법을 간략하게 정리하면 다음과 같다. 건조된 용기에 질소를 통과시키면서 resorcinol monobenzoate(2.14g 0.01mol)를 적가하고 아세토니트릴(CH₃CN 10ml)과 테트라히드로푸란(THF 10ml)으로 용해시킨 다음 탄산칼륨(K₂CO₃ 1.38g 0.01mol)을 첨가하고 2,2-디플루오로-1-트리플루오로메틸-3',5'-디클로로스타렌(3.32g 0.012mol)을 가하고 실온에서 6시간 교반시켜 화합물 KO-200978 3.91g을 얻었다(수율 83%). ¹H NMR δ (300MHz, CDCl₃) : 8.20~6.96(m, 12H), MS : 471(12), 257(23), 105(100), 77(38). 이어서 KO-200978 화합물(471mg 1mmol)을 메탄올(10ml)에 녹이고 수산화나트륨(NaOH 80mg 2mmol)을 첨가하여 실온에서 2시간 교반 후 KO-200977 화합물 283mg을 얻었다(수율 77%). H NMR δ (300MHz, CDCl₃) : 7.45~6.64(m, 8H), 5.48(bs, 1H), MS : 367(22), 159(21), 110(100), 93(37) 특히 KR 0285539, page 12, 제조실시예, 47번 참고(2,2-디플루오로-1-트리플루오로메틸-3',5'-디클로로스타렌)이상과 같이 합성한 시험화합물 17개에 대한 구조를 그림 3-3-13에 나타내었다.

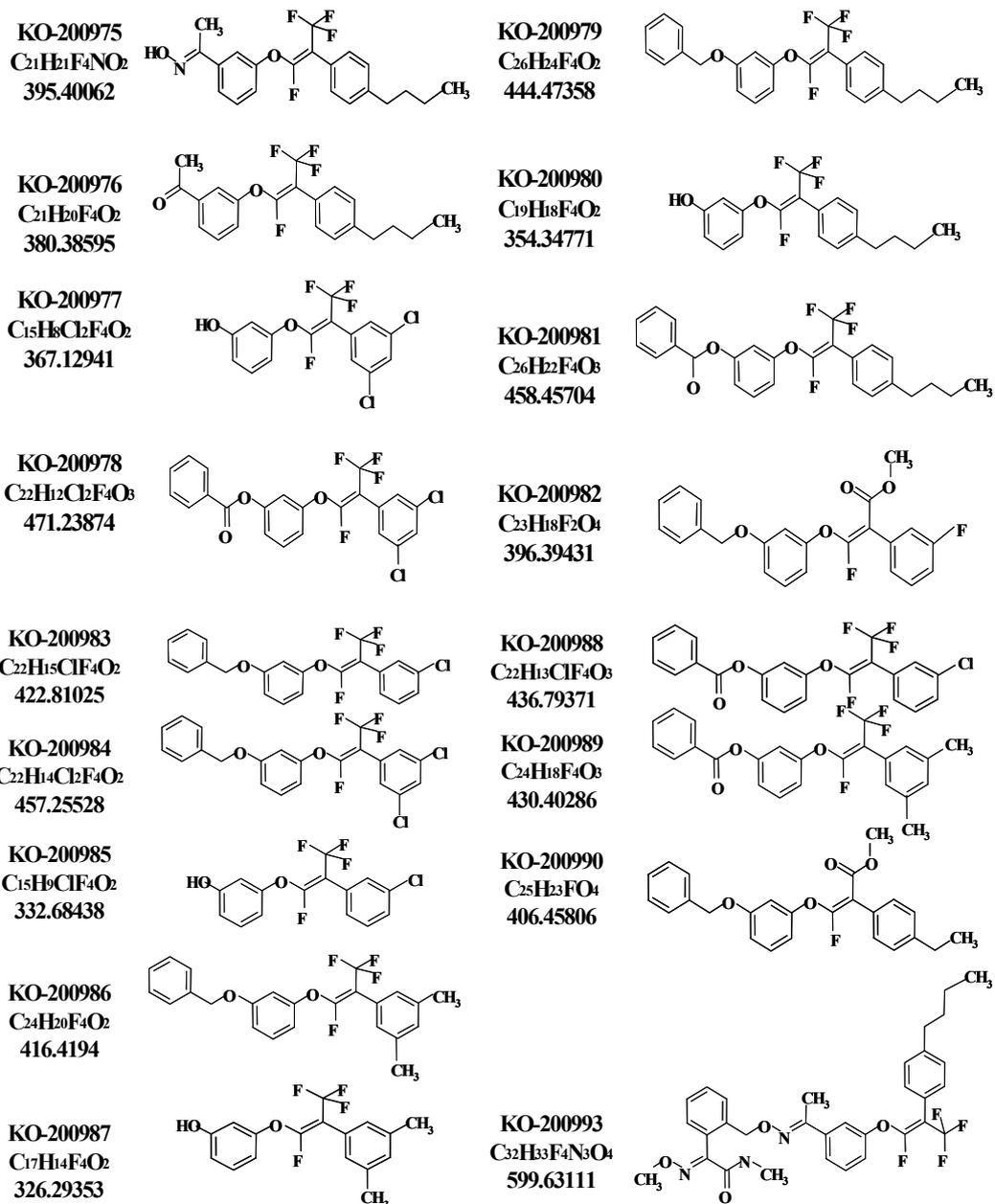


Fig. 3-3-13. Compounds synthesized derivatives for CAD inhibiting herbicide candidate.

3. 결과 및 고찰

가. 신규 작용점 CAD 확정: AtCAD에 대한 DNA 분석과 cDNA library construction 제작, 형질전환 *E. coli*로부터 AtCAD protein의 발현, Antisense AtCAD construct 제작 및 *Arabidopsis thaliana*로의 형질전환, Antisense AtCAD construct가 형질전환된 T₁ 애기장대의 lethality 확인 등을 통하여 CAD가 결핍되면 심한 생육 억제로 인하여 성장하지 못하고 고사됨을 확인하여 신규 제초제 작용점으로서 Coniferyl alcohol dehydrogenase (CAD)를 발굴하였다. 즉, CAD를 암호화하는 유전자결핍 식물체를 통하여 생존필수효소임을 확인하였다(Fig. 3-3-14).

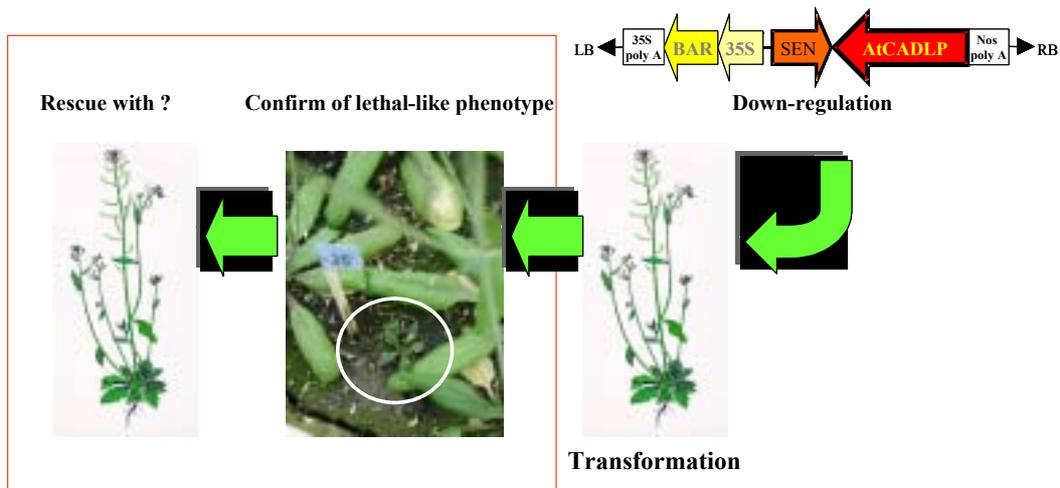


Fig. 3-3-14. Confirm of phenotypic characterization for transgenic plant.

Lignin은 식물체의 기계적 지지를 담당하는 성분으로서, 생물학적으로 볼 때 식물체에 없어서는 안 되는 성분이다. Lignin은 또한 병원균의 침입과 증식에 대한 물리적인 장벽으로 기능함으로써 식물체의 질병 저항성을 높여주는 작용을 갖고 있기도 하다. Lignin이 담당하고 있는 상기와 같은 역할 때문에, 모든 식물체에는 인간이나 동물에는 존재하지 않는 lignin 생합성 과정이 필수적으로 존재하고 있다. 이러한 lignin의 생합성 과정은 일련의 과정을 거쳐 진행되게 되는데, 먼저 전구물질인 L-phenylalanine이 phenylalanine ammonia-lyase, ferulate 5-hydroxylase, hydroxycinnamate CoA-ligase 등의 효소들에 의해서, coumaric acid, ferulic acid 및 sinapic acid를 형성하는 과정이다. 이 과정이 바로 phenylpropanoid pathway인데 이는 일반적인 경로로서

lignin 생합성에 특이적인 경로는 아니다. 상기 산들이 cinnamoyl CoA reductase(CCR)에 의해서 cinnamaldehydes, 즉 coniferaldehyde, coumaldehyde, sinapaldehyde로 환원되고, 그 cinnamaldehyde가 cinnamyl alcohol dehydrogenase(CAD)에 의해서 모노리그놀인 신나밀 알콜, 즉, coniferyl alcohol, p-coumaryl alcohol 및 sinapyl alcohol로 전환되는 과정이다. 이 과정은 리그닌 생합성에 특이적인 경로이다. 위 신나밀 알콜은 최종적으로 peroxidase, laccase등에 의해서 lignin으로 합성되게 된다. Lignin의 생합성 과정이 이러하기 때문에, 위 lignin 생합성의 특이적 경로에 관여하고 있는 신나밀 알콜 탈수소화 효소의 기능이 저해되게 되면 리그닌 생합성이 저해될 가능성이 있다. 이는 리그닌은 식물체 있어서 생물학적으로 그 중요성이 크기 때문에 리그닌 생합성의 저해가 식물의 성장 저해로 이어질 수 있음을 시사하는 것이다.

나. 발현된 AtCAD의 효소특성분석 및 HTS system 구축: CAD를 암호화하는 유전자 형질 전환 대장균으로부터 CAD를 대량생산하기 위하여 최적 조건을 확립하고, AtCAD 단백질의 효소 활성도를 30°C로 조절되는 Benchmark™ Microplate Reader(BMS)와 96-well을 이용하여 측정하였다(Fig. 3-3-16). 정제된 단백질의 효소 활성도는 정반응 기질 100mM coniferyl alcohol 또는 역반응 기질 100mM coniferyl aldehyde에 대한 Michaelis-Menten kinetics에 적합하였으며, 기질 각 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여, 이중역수 도표(Lineweaver-Burk's plot)로 나타낸 결과, 정반응의 K_m 값 및 V_{max} 값이 각각 $3.7 \times 10^{-5} M$ 및 0.102(Fig. 3-3-16), 역반응은 각각 $1.98 \times 10^{-4} M$ 및 0.238,으로 나타났다(Fig. 3-3-17). 이러한 결과는 AtCAD 유전자로부터 발현되는 단백질이 정반응 기질 100mM coniferyl alcohol 또는 역반응 기질 100mM coniferyl aldehyde에 대한 기질 특이성을 갖는 cinnamylalcohol dehydrogenase임을 나타내었다. Lineweaver- Burk's plot을 이용한 enzyme kinetics 분석결과에서 나타난 것처럼 분석한 결과 lignin을 합성하는 정방향인 coniferyl aldehyde로부터 coniferyl alcohol로 변화되는데 관여하는 효소의 기질에 대한 친화도 K_m value가 역방향에 비하여 4.6배 높게 나타나 생체 내에서의 방향성을 표현하고 있다. 즉, 역방향의 CAD 활성은 생체 내에서의 조절작용이라는 것으로 해석할 수 있었다.

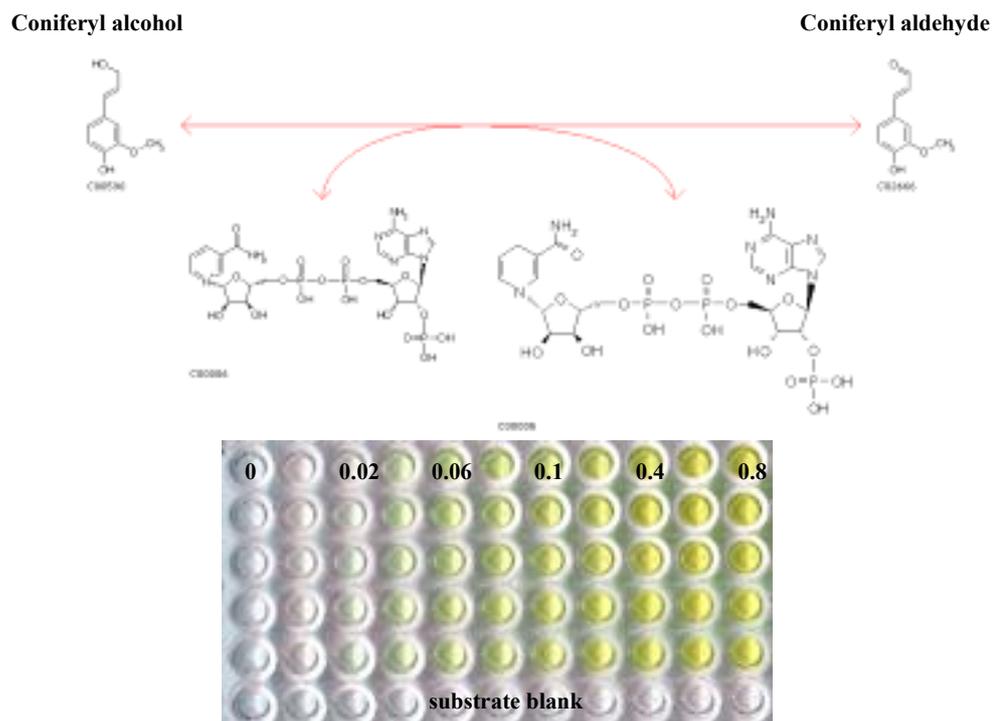


Fig. 3-3-15. Reaction mechanism and 96-well after reaction.

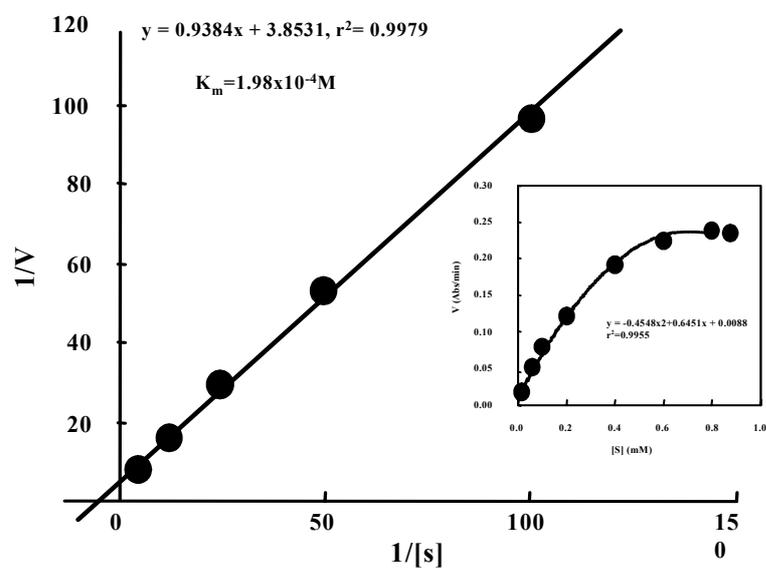


Fig. 3-3-16. CAD Kinetics in coniferyl alcohol to aldehyde.

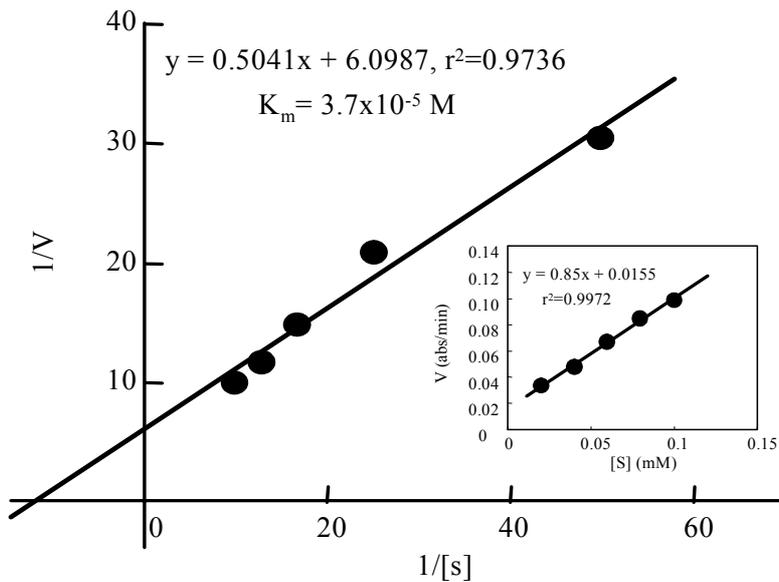


Fig. 3-3-17. CAD Kinetics in coniferyl aldehyde to alcohol.

다. AtCAD 저해제 발굴: 먼저 그림 3-3-18에는 식물특정 효소저해 화합물질 (120개)로부터 탐색한 hit의 구조를 나타내었다. Nordihydroguaiaretic acid (MW 302.4, IC_{50} 0.18 mM), Agaricic 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) 등이었다(Fig. 3-3-18). 이들은 아직까지 CAD와 관련된 활성이 보고 되어 있지 않기 때문에 신규 CAD 저해제로서의 기능을 발휘하게 될 것이며, 보다 강력한 CAD 저해 제조제를 합성하는데 유용한 정보를 제공하게 될 것이다. 또한 유도체를 합성하는데 lead compound로서 이용하게 될 것이다. 이어서 *in vitro* 실험결과와 *in vivo* 실험결과를 비교 분석하기 위하여 *Arabidopsis thaliana*를 이용하여 발아 후 초기생육에 대한 hit 화합물들의 생물활성을 조사한 결과(Fig. 3-3-19) *in vitro*에서 hit로 선발되었던 화합물 중에서 Itaconic acid와 Nordihydroguaiaretic acid 등은 *in vivo*에서도 뚜렷한 저해활성을 나타내어 CAD 저해 제조제의 개발 가능성을 높게 해주었다 (Table 3-3-1).

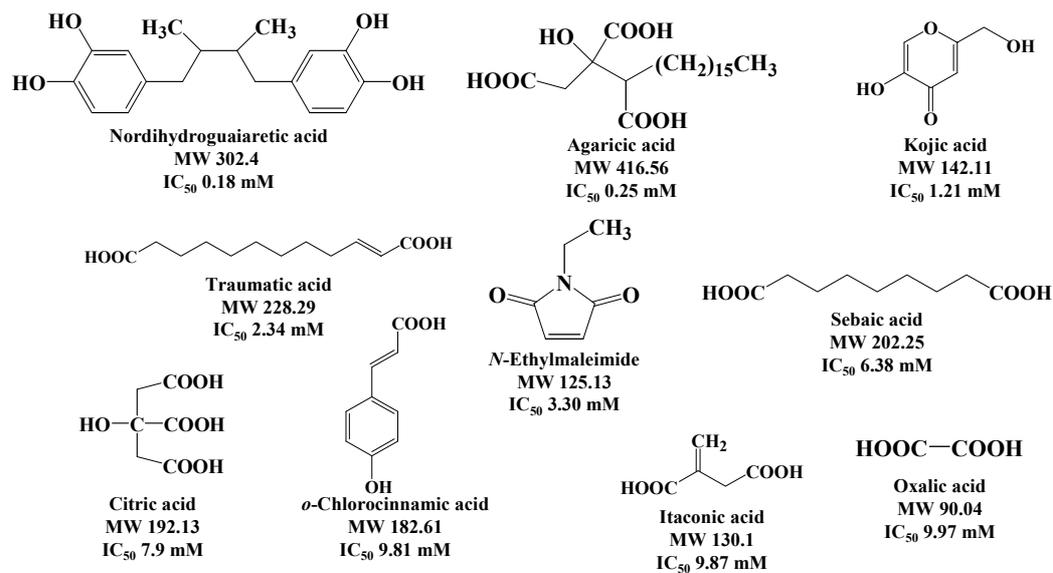


Fig. 3-3-18. Valuable leads from 120 plant specific enzyme inhibitors tested for developing CAD inhibiting herbicide.

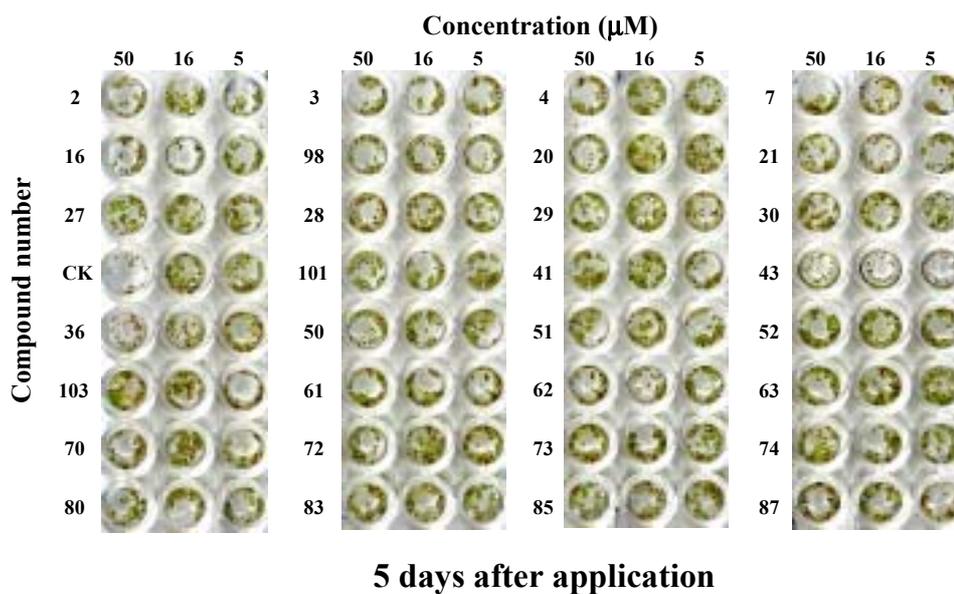


Fig. 3-3-19. *In vivo* test with *Arabidopsis thaliana*.

Table 3-3-1. HIT compound selected from *in vivo* Arabidopsis germination test

<i>In vitro</i>	HIT compound	<i>In vivo</i>			
I₅₀(9.87μM)	Itaconic acid	50μM	16μM	5μM	0
I₅₀(0.175μM)	Nordihydroguaiaretic acid	50μM	16μM	5μM	0

이어서 한국화학연구원의 화합물은행에서 보유하고 있는 35,000여개 중 40% 이상 저해하는 물질은 모두 21개 이었고 반응을 촉진하는 물질은 모두 111개가 탐색되었다. 이들 중에서 70% 이상 억제하거나 촉진하는 물질을 정리하였다(Table 3-3-2). 특히 정제되지 않은 천연물 1차 분획물들이 있어 흥미롭게 생각되었다. 이들이 정제되어 순도가 높아지면 활성이 더욱 증대될 것이기 때문이다. 이들 중에서 대표적인 화합물의 구조를 그림 3-3-20에 표기하였다.

Table 3-3-2. Hit compounds for coniferyl alcohol dehydrogenase inhibitors among chemicals of CB in KRICT

Code No.	IC ₅₀ (μM)
A0279-E09	6.7
A0358-B10	6.9
A0358-B11	7.9
A0226-H08	9.9
A0092-H09	19.0
EX0014-A12	23.3
EX0013-D12	23.7
CB0075-G09	27.3
A0313-F08	31.0
NCB013-E11	51.0

* Tested compounds : 65,000ea

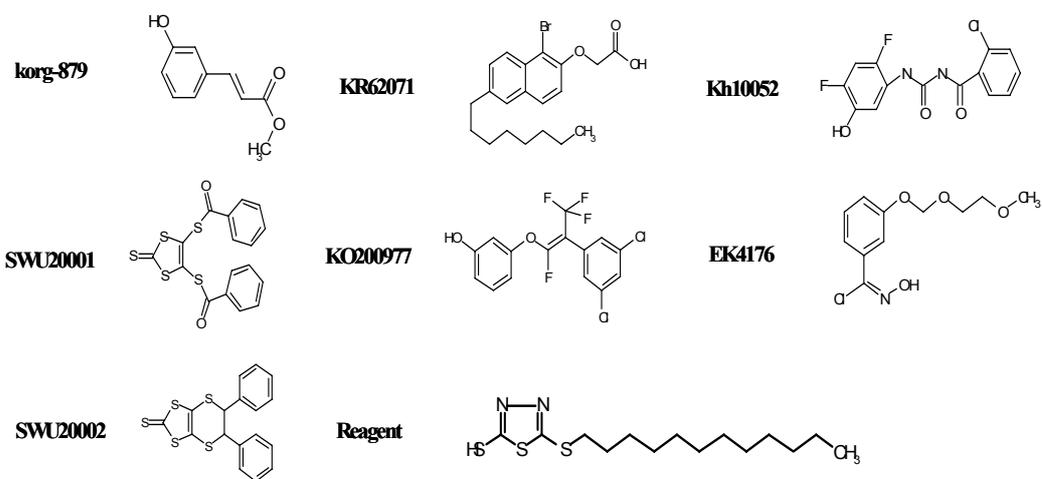


Fig. 3-3-20. Valuable leads from 45,000 chemicals in KRICT Chemical Bank tested for developing CAD inhibiting herbicide.

제 4절 후보화합물 발굴(온실 및 포장시험)

1. 서론

가. 생리활성 물질의 온실시험

시험목적: 임의로 선발한 생리활성 물질을 KAPAS 또는 CAD를 대상으로 효소 활성 정도를 확인하였는데, 일부 생리활성 물질에서는 효소 억제 활성을 보이고 있었다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 온실시험을 통해 이들 화합물의 제조 활성 정도 및 특성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법: 멸균된 사질 토양에 1g/포트 량으로 비료를 혼합시킨 다음 시험용 플라스틱 사각 포트(350cm²)에 담아 파종구를 만든 다음 실험용 잡초를 파종하고(Table 3-4-1), 굵게 친 흙으로 복토하여 온실에 두었다. 각 시험 화합물을 칭량하여(8kg a.i ha⁻¹) acetone 또는 dimethyl sulfoxide(DMSO) 등의 용매에 녹인 다음 비이온성 계면활성제(Tween-20)가 첨가된 증류수로 희석하여 포트 당 14ml를 분무 처리하였으며, 유기 용매의 최종 농도는 acetone은 60%, DMSO는 1%가 넘지 않도록 하였다. 이때 발아전 처리(Pre-treatment)는 파종 후 1일, 발아 후 경엽 처리(Post-treatment)는 파종 14일 후에 조제된 약제를 처리하였다. 약제를 처리한 식물은 온실에서 2주간 키운 다음 이들의 제조 효과를 형태 및 생리학적 관찰 근거에 의하여 달관 조사하였다(Table 3-4-2). 방제 효과가 전혀 나타나지 않으면 0, 완전히 방제하면 100으로 하여 11등급으로 각각의 제조 활성 정도를 평가하는데, 70 이상의 활성을 나타내면 그 식물에 대한 제조 효과가 있다고 인정하였다(Table 3-4-3).

결과 및 고찰: 생리활성 물질에 대한 제조 활성 평가 결과, 토양 처리에서만 효과가 있는 화합물이 5약제, 경엽 처리에서만 효과를 발현하는 화합물이 31약제, 그리고 토양과 경엽 처리 모두에서 효과를 발현하는 화합물이 29약제이었다(Table 3-4-4). 또한 제조 활성이 있는 생리활성 물질의 주요한 증상은 왜화(Stunting), 고사(Desiccation), 갈변(Chlorosis), 호르몬 활성((Nastic response or altered leaf and stem structure), 농록화(Darker green leaves), 백화(Bleaching) 등이었다(Photo 3-4-1).

Table 3-4-1. Test plants used in herbicide screening

Abbreviation	Scientific name	Korean name	English name
SORBI	<i>Sorghum bicolor</i>	수수	Common sorghum
ECHCG	<i>Echinochloa crus-galli</i>	피	Barnyardgrass
AGRSM	<i>Agropyron smithii</i>	개밀	Cheatgrass
DIGSA	<i>Digitaria sanguinalis</i>	바랭이	Large crabgrass
PANDI	<i>Panicum dichotomiflorum</i>	미국개기장	Fall panicum
SOLNI	<i>Solanum indica</i>	까마중	Black nightshade
AESIN	<i>Aeschynomene indica</i>	자귀풀	Indian jointvech
ABUTH	<i>Abutilon avicennae</i>	어저귀	Velvetleaf
XANSI	<i>Xanthium strumarium</i>	도꼬마리	Cocklebur
CAGHE	<i>Calystegia japonica</i>	메꽃	Bindweed

Table 3-4-2. Life table parameters

Rating percent control	Description of main categories	Crop description	Weed description
0	No effect	No crop reduction or injury	No weed control
10	Slight effect	Slight discoloration or stunting	Very poor weed control
20		Some discoloration stunting or stand loss	poor weed control
30		Crop injury more pronounced but not lasting	Poor to deficient weed
40	Moderated effect	Moderate injury, crop usually recovers	Deficient weed
50		Crop injury more lasting, recovery	Deficient to moderate weed control
60		Lasting crop injury no recovery	Moderate weed control
70	Severe effect	Heavy injury and stand loss	Control somewhat less than satisfactory
80		Crop nearly destroyed a few survivors	Satisfactory to good weed control
90		Only occasional live plants left	Very good to excellent control
100	Complete effect	Complete crop destruction	Complete weed destruction

Table 3-4-3. Description of footnotes

- A : Necrosis or necrotic spots
- B : Stunting
- C : Desiccation
- D : Axillary growth stimulation or tillering
- E : Nastic response + altered leaf/stem structure
- G : Growth stimulation
- H : Defoliation
- I : Chlorosis or abnormal color of plant
- M : Negative root geotropism
- N : Bleaching (Lack of pigmentation)
- P : Darker green leaves
- R : Abnormal root growth
- U : Other unique symptoms
- X : No valid data ; This will be used for any instance where the data are question.

이 생리활성 물질 중에서 bromuconazole은 경엽 처리 효과에 비해 상대적으로 토양 처리 효과가 우수하며, 왜화, 호르몬 활성, 농록화 등 다양한 외형적인 증상을 나타내고 있었다. DNOC의 경우에는 토양 및 경엽 처리에서 까마중을 포함한 5종의 광엽 잡초를 완전 방제하고 있었다. 또한 etaconazole은 왜화, 갈변, 농록화 등의 다양한 증상을 나타내며, 특히 다른 화합물에서는 토양 처리에서 살초 효과가 낮았던 개밀에 대한 방제 효과가 상당히 우수하였다. TBTO는 토양 및 경엽 처리 효과 모두 우수하여 수수와 개밀을 제외한 모든 초종을 완전 방제하였다(Photo 3-4-2). Pentachlorophenol은 토양 및 경엽 처리에서 잡초 방제 효과가 우수하였으며, 특히 경엽 처리에서는 개밀을 제외한 모든 초종을 완전 방제하였다. Flubenzimine은 토양 처리 효과는 없고 경엽 처리에서만 강력한 제초 활성을 나타내며, 특히 5종의 광엽 초종은 완전 방제시키고 있었다. 또한 naptalam은 토양 처리 효과를 보이고 있으며 줄기나 잎이 휘어지는 호르몬 효과를 나타내고 있었다. 그러나 경엽 처리에서는 화분과에 대한 방제 효과는 없고 광엽 초종에 대해서만 방제 효과를 나타내 화분과 초종에 대한 선택성에 대한 고찰이 필요할 것으로 생각되었다.

생리활성 물질 중에서 특히 dichlone과 fentin-acetate는 *in vitro* 시험에서 PAPAS에 대한 저해 활성 정도가 각각 83% 및 81%이었다. Dichlone은 곰팡이로 인한 병해를 막기 위한 살포제나 종자 소독제로 사용되는데, 작용기작은 SH 효소를 저해함으로

서 살균 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 fentin-acetate 역시 살균제로 사용되는 시약으로 ATP 활성이나 미토콘드리아에서의 인산화 과정에서 산화를 저해함으로써 살균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이들에 대한 온실시험 결과는 두 약제 모두 토양 처리 효과는 없고 경엽 처리 효과만 있었는데, fentin-acetate는 개미를 제외한 모든 초종에 대한 방제 효과가 상당히 우수하였으며, 특히 5종의 광엽 잡초는 완전 방제시키고 있었다. 그러나 dichlone은 제초 활성 정도가 다소 약한 편이었다.

Table 3-4-4. Herbicidal efficacy of biochemical reagents

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
2-Phenyl phenol	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30C	50BC	0	60BC	0	0	0	10	0	0
8-Hydroxy quinoline sulfate	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aldimorph	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anilazine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	50BCI	50BC	0	50BC	10	0	70BC	0	0	0
Azaconazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Benalaxyl	8	Pre	0	0	0	60BN	30B	0	0	0	0	0
		Post	50BC	60BC	0	70BC	20	0	70BC	40C	0	30
Benodanil	8	Pre	0	0	0	30BN	0	0	20N	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Benomyl	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Binapacryl	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	70BC	60BC	30	70BC	50BC	100	95	100	100	100
Bipenyl	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bromuconazole	8	Pre	80BP	100	0	100	90B	100	80BP	95BP	10	100
		Post	50BC	70BC	40B	80	40BC	50BC	60BE	50BP	60BP	100
Bupirimate	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30BC	30	20	70BC	0	10	30C	0	0	0
1-Butylamine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Captafol	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	10	0	0	10	10	10	0	0	0	0
Carbendazim	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continued 1

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Chinomethionate	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30BC	40BC	0	60BC	20	50BC	20	30	0	0
Chloroneb	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Climbazole	8	Pre	0	0	0	50B	40BP	0	100	30BP	0	0
		Post	40BC	50BC	0	60BC	40BC	70BC	40BI	50BC	40BP	40BC
Cyprodinil	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	90C	70BC	10B	90C	80C	30	30	20	10	40C
Dazomet	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0
Diclone	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40CI	50CI	0	50BC	40BC	40BC	60BC	20	10	40C
Dichlorophen	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30CI	40BC	0	60BC	20	10	60BI	0	80B	40BC
Diclobutrazol	8	Pre	40BP	80BP	0	95	80BP	100	80BP	70BP	100	80BP
		Post	20	30B	0	40BP	10P	50BP	30BP	30BP	40EP	20P
Dicloran	8	Pre	0	0	0	20B	40B	60B	0	0	0	0
		Post	40CI	30	0	40BC	40BC	95	20	40BC	20	20
Diethofencarb	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Difenoconazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	10	20	0	30BP	20	30	30P	40BP	0	0
Diniconazole	8	Pre	40BP	100	20	100	90	80BP	70BP	70BP	40BP	0
		Post	20	30BP	10	60BP	10	80BP	40BP	40BP	60BP	30
Dinobuton	8	Pre	0	0	0	0	70B	10	0	0	70B	0
		Post	80C	60BC	20	80C	95	100	60BC	30	100	100
Dinocap	8	Pre	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
		Post	50BC	40BC	30BC	50BC	40BC	100	70C	80	100	100
Diphenylamine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	90BC	40B	0	70BC	20	90	30BC	30	20	40BI
Ditalimfos	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	50BI	40BC	20	50BC	40BC	40BC	20	30	100	100
Dithianon	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DNOC	8	Pre	0	20	0	95	100	100	100	100	100	100
		Post	90C	95C	50C	100	100	100	100	100	100	100
Dodemorph	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30CI	30	0	60BC	30	20	20	0	30	10
Dodine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40C	30	0	60BC	50BC	95	60BC	30	40BC	0

Continued 2

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Drazoxolon	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epoxiconazole	8	Pre	95BI	95BI	40BP	100	95BI	95	90BC	90BP	60BC	100
		Post	20P	30BP	0	40BP	20BP	20	30BP	30BE	40BE	20
Etaconazole	8	Pre	50BP	95BP	95BP	100	100	95BP	70BP	80BP	0	100
		Post	80C	90BP	40BC	100	50BC	90	60BC	90BP	60BC	60BP
Ethirimol	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethoxyquin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenamino sulfate	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenbuconazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	20	0	0	30BC	40BC	0	20	0	95B	0
Fenpiclonil	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	20	0	0	30	0	0	0	0	0	0
Fenpropidin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	50BC	50BC	0	40BC	20	50BC	50C	95	50BP	30
Fenpropimorph	8	Pre	70BI	90BC	0	95BI	95BI	0	0	0	0	0
		Post	30C	40CI	0	60BC	30	0	20	0	0	0
Ferbam	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fluotrimazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	30P	0	20P	0	20
Flutolanil	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flutriafol	8	Pre	40CI	100	80B	100	100	100	95BI	70BP	70B	100
		Post	40CI	30	20	40BC	40BC	60BC	70BC	80BC	50BP	40BP
N-Phenyl thiourea		Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-Chloranil	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pentachloroethane	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pentamethyl benzene	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBTO	8	Pre	60B	100	40BC	100	100	100	100	100	100	100
		Post	90	100	40BC	100	100	100	100	100	100	100
Tebuconazole	8	Pre	70BP	95BI	20	100	100	95	70BP	40BP	100	100
		Post	40C	60BC	20	70BC	40BC	70BC	40BC	40BP	70BE	40BP

Continued 3

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Zinoc	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irobenfos	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40C	30	0	90C	40C	70C	20	0	0	0
Mancozeb	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maneb	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mepronil	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methfuroxam	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chloropicrin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Myclobutanil	8	Pre	0	70B	0	100	90	100	40B	40B	100	100
		Post	30CI	50BC	30	80C	50BC	50BP	50BC	50BE	20	40BP
Nabam	8	Pre	0	0	0	40B	95	0	0	0	0	0
		Post	40BC	40C	0	70BC	80	80C	30	40C	30C	0
Oethilinone	8	Pre	0	20	0	30	100	30B	0	0	0	0
		Post	95	80C	30C	100	100	100	95	100	100	100
Ofurace	8	Pre	0	30	0	80BI	70BI	30	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxadixyl	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Oxycarboxin	8	Pre	10	20	0	20	10	0	40BC	30BC	80B	20
		Post	10	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Penconazole	8	Pre	95BP	50B	20	100	95BP	95	80BP	60BP	0	40BC
		Post	70BC	70BC	2BC	80BC	70BC	100	60C	100	100	100
Prochloraz	8	Pre	0	0	0	95	30	40B	0	0	0	0
		Post	40C	30C	10	70C	30	40BP	0	30BP	40BP	30
Ropiconazole	8	Pre	40BP	95	20	100	70BC	100	70BP	100	0	95
		Post	40C	30BC	0	95	70BC	70BC	30BC	100	40BP	60BP
Pyracarbolid	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pyrazophos	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glyodin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Griseofulvin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continued 4

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Hexachlorobenzene	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexachlorobutadiene	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexaconazole	8	Pre	90BP	95B	40B	100	100	100	80BP	80BP	90B	100
		Post	50CI	70BE	30C	100	30C	90C	95C	100	40CE	30
Fenfuram	8	Pre	0	90B	10	90B	90B	60B	70BI	20	100	20I
		Post	95	100	30	100	100	100	95C	100	70C	20
Pentachlorophenol	8	Pre	0	100	20	100	100	100	100	90	100	90
		Post	100	100	70BC	100	100	100	100	100	100	100
2-Aminobutane	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7-Bromo-5-chloro	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40C	60C	30C	70BC	80BC	100	95C	100	40C	40C
Acetonchloroform	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-Chlordecane	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyprofuram	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40C	60BC	20	50C	60BC	50BC	60BC	70BC	40C	60C
Eugenol	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenclorim	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fentinacetate	8	Pre	20	100	20	100	100	100	50B	20	100	0
		Post	70CI	70BC	30	90C	100	100	100	100	100	100
Flubenzimine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	70CI	95	40C	100	100	100	100	100	100	100
Fuberidazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	70C	50BC	0	70BC	70BC	100	100	100	40C	40C
Hexachlorophen	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30CI	70BC	20	70BC	100	100	100	100	100	50C
Morpholine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	30E	0	0	0
Naptalam	8	Pre	70BE	80BE	30	60BE	70BE	70B	80BE	40E	90BE	90BE
		Post	0	0	0	0	0	50E	40E	100	100	100
Nirit	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	20	40BC	0	90C	90C	90C	60CE	20	40B	40C
Pyroquilon	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40C	70C	20	60BC	50BC	80C	60C	100	40C	90C

Continued 5

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Quinoxifen	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quintozene	8	Pre	90BP	100	50B	100	100	95	80BP	70BP	95BP	90BP
		Post	70C	50C	30	95	80C	90C	50CE	95	50BP	20
Tebuconazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tecnazene	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	100	0	100	60BC	50C
Thiabendazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thiram	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tolyfluanid	8	Pre	0	0	0	0	60B	0	0	0	0	0
		Post	20	40C	0	80BC	70BC	20	60C	30	40C	0
Triadimefon	8	Pre	90BP	100	60B	100	95	90C	50C	100	40BP	40B
		Post	50C	90	0	100	95	90C	50C	100	40BP	40B
Triazoxide	8	Pre	0	70B	0	80B	95	90B	20	20	100	0
		Post	80C	95	40C	100	100	100	100	100	90C	100

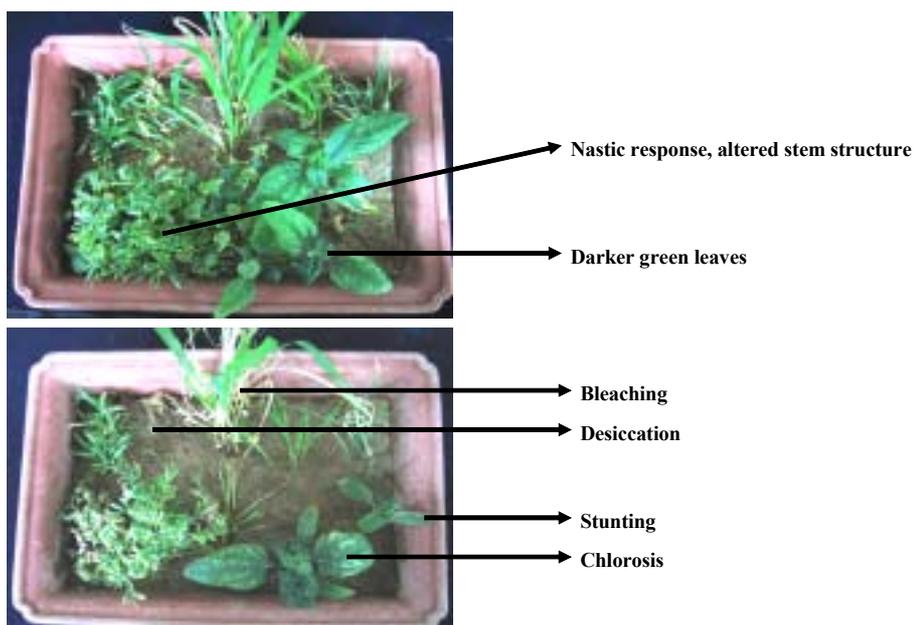


Photo 3-4-1. Major symptoms of weeds to biochemical reagents.



Bromuconazole



DNOC



Etaconazole



TBTO

Photo 3-4-2. Herbicidal efficacy of postemergence treatment of several biochemical reagents on grass and broad leaf species.

나. 진전단계 시험

시험목적: 생리활성 물질 중에서 dichlone과 fentin-acetate는 *in vitro* 시험에서 PAPAS에 대한 저해 활성 정도가 각각 83% 및 81%이었다. 이들 물질에 대한 온실 시험 결과 8 kg a.i ha⁻¹ 농도에서 diclone은 토양 처리 효과는 없고 경엽 처리 효과만 있는 것으로 나타났으며, fentin-acetate는 토양 및 경엽 처리 모두 잡초 방제 효과가 상당히 우수하였다. 따라서 이들 생리활성 물질에 대하여 농도 확인 시험을 통해서 제초 활성 정도와 약제의 특성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법: 과종 및 약제 처리 등은 1차 온실시험과 동일하게 수행하였으며, 처리농도는 4, 2, 1, 0.5, 0.25 kg a.i ha⁻¹이었다. 단, 이들 생리활성 물질의 약효 발현이 속효성이기 때문에 경엽처리의 경우에는 약제 처리 7일 후에 검정하였다.

결과 및 고찰: 처리한 농도 범위 내에서 fentin-acetate는 광엽 초종에 대한 효과가 매우 우수하였고, diclone은 제초 활성이 거의 없는 것으로 나타났다(Table 3-4-5). Diclone은 4 kg a.i ha⁻¹ 농도에서 토양 처리 효과는 없고 경엽 처리에서도 일부 초종에 대해서만 방제 효과가 있었지만 방제율이 30% 이하로 아주 낮았다. 또한 2 kg a.i ha⁻¹ 이하의 농도에서는 제초 활성이 전혀 없었다. 한편, fentin-acetate는 처리 농도 범위 내에서 경엽 처리 효과가 있었으며, 특히 광엽 초종에 대한 방제 효과는 상당히 우수한 것으로 나타났다. 4 kg a.i ha⁻¹ 농도에서의 토양 처리 효과는 바랭이, 미국개기장 및 까마중의 방제 효과가 각각 70, 100 및 80%이었고, 그 외의 초종에서는 방제 효과가 없었다. 경엽 처리에서는 수수, 돌피, 개밀, 바랭이 및 미국개기장 등 화본과 초종에 대한 방제 효과는 각각 70, 70, 50, 60 및 100%이었고, 까마중을 포함한 5종의 광엽 초종은 완전 방제되었다. 이러한 광엽 초종에 대한 방제 효과는 0.5 kg a.i ha⁻¹ 농도까지도 우수하게 나타났는데, 이 농도에서 까마중, 자귀풀, 어저귀, 도꼬마리 및 메꽃에 대한 방제 정도는 각각 80, 95, 100, 100, 100%이었다. 특히 경엽 처리에서의 약효 발현 속도는 상당히 속효성으로 약제 처리 3일 후부터 외형적인 증상이 나타났으며, 주요한 증상은 왜화, 고사, 갈변 등이었다.

Table 3-4-5. Dose-response of diclone and fentin-acetate

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH	
Diclone	4	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	30	20	0	20	30	0	20	0	0	0	
	2	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.5	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.25	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Fentin-acetate	4	Pre	0	0	0	70BC	100	80	0	0	0	0
			Post	70CI	70BC	50BC	60BC	100	100	100	100	100	100
2		Pre	0	0	0	0	0	40BC	0	0	0	0	
		Post	40C	60	60	50	80	100	100	100	100	100	
1		Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	40	40	0	50	60	80	95	100	100	100	
0.5		Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	40	40	0	50	60	80	95	100	100	100	
0.25		Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Post	30	40	0	30	50	30	70C	40C	100	30	

다. 살균제 원제에 대한 온실시험

시험목적: 한국화학연구원 생명화학연구단 생물기능연구팀에서 보유하고 있는 살균제 원제를 대상으로 KAPAS 또는 CAD의 효소 활성 정도를 측정하였으며, 효소 활성을 저해하는 살균제를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 근거로 온실 시험을 통해 이들 살균제의 KAPAS 또는 CAD를 저해함으로써 발현되는 제초 활성 정도를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법: 파종을 포함한 모든 처리는 1차 온실시험과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰: 살균제 원제 중에서도 상대적으로 고농도에서는 제초 활성을

나타내는 약제가 있었다(Table 3-4-6). Blastidin-S는 토양 처리 효과는 거의 없지만, 경엽 처리 효과는 상당히 우수하게 나타났는데 특히 광엽 초종에 대해서는 완벽한 방제 효과를 나타내었다. Nuarimol은 토양 및 경엽 처리 모두 제초 활성을 나타내고 있는데, 상대적으로 토양 처리 효과가 우수하여 화본과인 개밀과 광엽 초종 중에서 어저귀를 제외하고 완전 방제 되었다. Tebuconazole 또한 토양 처리에서 수수, 돌피, 바랭이, 미국개기장 등의 화본과 초종에 대한 방제 효과가 우수하였다. 그러나 광엽 초종에 대한 방제 효과는 다소 부족한 편이었다.

이러한 결과는 살균제로 이미 사용되고 있는 화합물 중에서도 KAPAS 또는 CAD를 저해함으로써 제초 활성을 나타내는 것으로 판단되며, KAPAS 또는 CAD가 새로운 작용점일 가능성을 시사하고 있다고 추측할 수 있었다.

Table 3-4-6. Effect of preemergence and postemergence treatment of fungicide

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Benomyl	8	Pre	0	0	0	0	B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Blastidin-S	8	Pre	0	0	0	0	70B	0	0	0	0	0
		Post	95C	70C	90C	100	100	100	100	100	100	100
Captafol	8	Pre	0	0	0	0	70B	0	0	0	0	0
		Post	10	10	0	60BC	10	50BC	40C	30	40C	30
Captan	8	Pre	0	0	0	0	95	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0
Carbendazim	8	Pre	0	0	0	0	40B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carboxin	8	Pre	0	0	0	0	70B	0	0	0	100	0
		Post	40C	40C	20	80C	95C	100	70CE	100	100	70C
Carpromid	8	Pre	0	30B	0	0	40B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorothalonil	8	Pre	0	0	0	0	95	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cymoxanil	8	Pre	30B	30B	0	60B	40B	20	30B	0	50B	90
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dichlorofluanid	8	Pre	0	70BI	0	20	70B	20	30B	20	30C	0
		Post	40CI	70BC	0	80C	40BC	20	30C	20	30C	0
Diethofen carb	8	Pre	0	70BI	0	0	60B	20	0	0	0	0
		Post	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0

Continued 1

Chemical	Rate (kg/ha)	Ttt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Diethmorph	8	Pre	0	0	0	0	95B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	50C	20C	0	0	0	0	0
Dithianon	8	Pre	0	0	0	0	90B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	50C	20C	0	10	0	0	0
Ethaboxam	8	Pre	0	0	0	0	30B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Famoxa done	8	Pre	0	0	0	0	40B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenarimol	8	Pre	90BP	100	40B	100	100	100	30BP	40BP	20	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenhexamid	8	Pre	0	0	0	0	40B	0	0	0	0	0
		Post	40AC	70BC	0	90C	60BC	100	30	50BC	40BE	30
Ferimzone	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	10	20	0	20	20	70C	60C	70C	30	40C
Fluazinam	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30	50BC	0	80C	40BC	80BC	40C	50C	100	0
Fludioxonil	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	70C	50BC	30	100	40BC	60BC	90	90	50BC	60BE
Folpet	8	Pre	0	0	0	0	B	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Hexaconazole	8	Pre	80BP	100	30	100	100	95	95	95	10	90
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imazail	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	40BC	30	0	50BC	30	70BC	50C	90	20	20
Iprodione	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Isoprothiolane	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	20	20	0	70BC	20	0	40BE	0	10	0
Kresoxim	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	10	40BC	0	70BC	20	0	90	20	0	20
Mancozeb	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mepanipyrim	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Mepronil	8	Pre	0	100	0	40BN	1000	100	0	70B	0	90
		Post	50N	70BN	0	70BC	40BN	70BN	95	70BC	40N	30
Metalaxyl	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	10	10	0	40C	10	20	40C	30	10	0

Continued 2

Chemical	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANXI	CAGEH
Metominotr obin	8	Pre	30I	70B	20	70B	60B	6B0	50BI	20	30	70BC
		Post	60BC	70C	20	100	40BC	50BC	95	30	30	40C
Nuarimol	8	Pre	100	100	40BP	100	100	100	100	30	95	100
		Post	50BC	50BC	0	70BC	30	30P	50BP	50BP	40BP	40P
Pencyeiron	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prochloraz	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	20	20	0	40BC	30	40BP	40	50BP	30	0
Procymi done	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tebucona zole	8	Pre	100	100	40BP	100	100	95	90	70BP	20	100
		Post	40C	40BC	0	95	30	40BP	50BC	40BP	20	0
Thifluza mide	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	40BC	0	50BC	20	0	0	0	0	0
Thiophanate	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tolyflusanid	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	30	20	0	70BC	40BC	40BC	70C	30	40BP	0
Triadimefon	8	Pre	100	100	20	100	100	100	90	40BP	60BP	100
		Post	30	50BC	0	60BC	40BC	40BC	50C	50BP	40BC	0
Trichlamide	8	Pre	0	0	0	0	B	0	0	0	0	0
		Post	50BC	70BC	20	80	20	60BC	95	0	95	0
Trecyclazole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	20	20	0	30	20	30	70C	70C	70BC	0
Trifloxy strobin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	50BC	0	0	0	0	0	0
Triflumizole	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	50C	50BC	0	95	40BC	30	40C	50BC	0	0
Triforine	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Validamycin	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vinclozolin	8	Pre	100	100	0	100	95	80	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zoxamide	8	Pre	0	100	0	100	100	70BC	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

라. 살균제 원제에 대한 진전단계 시험

시험목적: KAPAS 또는 CAD를 저해하는 살균제 중에서 blastidin-S, nuarimol 및 triadimefon은 성체식물에 대한 제초 활성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 이들 살균제에 대하여 농도 반응을 조사해 봄으로써 KAPAS 또는 CAD가 새로운 제초제 작용점일 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법: 과종을 포함한 모든 처리는 1차 온실시험과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰: 시험한 세 가지의 살균제는 농도 의존적인 반응을 보이며 제초 활성을 나타내고 있었다(Table 3-4-7). Blastidin-S는 4 kg a.i ha⁻¹ 농도 수준까지 경엽 처리 효과가 있었으며, 특히 광엽 초종에 대해서는 이 농도에서 완벽하게 방제되고 있었다. 그러나 2 kg a.i ha⁻¹ 이하 농도에서는 토양 및 경엽 처리 모두 제초 활성을 나타내지 않았다. Nuarimol은 1차 시험과 마찬가지로 경엽 처리보다는 토양 처리 효과가 훨씬 강하게 발현되고 있었다. 토양 처리의 경우 2 kg a.i ha⁻¹ 농도에서 돌피, 바랭이, 미국개기장 등의 화분과 잡초와 까마중, 메꽃 등의 광엽 잡초를 완전 방제하고 있었으며, 1 kg a.i ha⁻¹ 농도에서도 바랭이와 미국개기장에 대한 방제 효과는 100%로 나타났다. 그러나 2 kg a.i ha⁻¹ 이하 농도에서는 경엽 처리 효과는 전혀 없었다. Triadimefon은 경엽 처리보다 토양 처리 효과가 상대적으로 우수하였으며, 토양 처리 4 kg a.i ha⁻¹ 농도에서 돌피, 바랭이, 까마중을 완전 방제하였다. 그러나 다른 초종에 대한 방제 효과는 약했으며, 경엽 처리 효과도 약한 것으로 나타났다.

이상의 세 가지 살균제는 상용 농도에서는 작물에 대한 안전성이 확인되어 사용되는 약제이지만, 본 시험에서와 같이 KAPAS 또는 CAD에 대하여 저해 활성을 나타내는 기존 살균제도 높은 농도에서는 제초 활성을 나타내기 때문에 이들이 새로운 제초제 작용점으로서의 가능성을 시사하는 것으로 생각할 수 있었다.

Table 3-4-7. Dose-response of several fungicide

Fungicide	Rate (kg/ha)	Trt.	SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANSI	CAGHE
Blastidin-S	8	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	80	100	80	100	90	100	100	100	100	100
	4	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	70C	70C	60C	100	20	100	100	100	100	100
	2	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Pre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nuarimol	8	Pre	100	100	70BP	100	100	100	95	80	80BP	100
		Post	40CI	60BP	20	80	60BC	40BP	70BP	50BP	50BP	90
	4	Pre	95	100	60	100	100	100	90	40BP	30	100
		Post	30	30	0	70BC	30	40	50	50	40	60BP
	2	Pre	70BP	100	0	100	100	100	80	30	0	100
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Pre	50	95	0	100	100	70BP	20	0	0	95	
	Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Triadi mefon	8	Pre	70BE	100	20	100	10	100	80	70BP	20	40BP
		Post	40CI	95	20	60BC	40BC	90	70BP	80	20	70BP
	4	Pre	10	100	0	100	95	100	70BP	60	0	40
		Post	30	40BC	0	40	40	80	30	20	20	50
	2	Pre	0	100	0	80	90	80	70	20	0	0
		Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Pre	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Post	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

마. 신규 합성된 phthalimide계 화합물의 제초 활성 특성

시험목적: 기존 살균제를 대상으로 KAPAS에 대한 활성 저해 정도를 확인한 결과 phthalimide, phenylsulfamide, quinone 등의 세 가지 계열의 화합물에서 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 이 세 가지 계열의 화합물 중에서 한국화학연구원 생명화학연구원 유기 합성실에서 신규로 phthalimide계 화합물을 합성하여 KAPAS 저해 활성을 조사하였다. 신규 합성된 120 개의 phthalimide계 화합물을 대상으로 KAPAS 50% 저해 농도(IC₅₀)를 산출하였는데 (Table 3-4-8), 이 중에서 50% 저해 농도가 0.3 mM 이하인 K-65, K-69, K-73을 선발하여 온실 조건에서 제초 활성 정도와 특성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법: 과종을 포함한 모든 처리는 1차 온실시험과 동일하게 수행하였으며, 처리 농도는 62.5 g a.i ha⁻¹이었다. 또한, 이들 화합물이 속효성이기 때문에 경엽 처리는 약제 처리 7일후에 검정하였다.

결과 및 고찰: 신규 합성한 세 가지의 phthalimide계 화합물은 62.5 g a.i ha⁻¹ 농도에서 토양 및 경엽 처리에서 우수한 제초활성을 보이고 있었다(Table 3-4-9). K-65의 경우에 토양과 경엽 처리 모두 공시한 10개 초종에 대하여 거의 완전 방제시키고 있었으며, K-69의 경우에도 토양 처리에서는 돌피와 개밀, 경엽 처리에서는 개밀을 제외한 모든 초종을 완전 방제시키고 있었다. 한편, K-73은 방제 효과가 다소 약하게 나타났는데, 경엽 처리에서는 까마중을 포함한 5 종의 광엽 잡초가 완전 방제되었다. 이들 화합물의 살초 특성은 약제 처리 후 약효 발현 속도가 상당히 빠르게 발현되는데, 약제 처리 1일 후에 외형적으로 증상이 발현되었으며, 주요한 증상은 고사와 같변이었다. 또한 식물체 내에서의 이행은 잘 이루어지지 않아 완전 고사되지 않은 개체는 약제 처리 후 일정 기간이 지나면 재생(Recovery)되었다.

이상의 시험 결과에 의하면 phthalimide계 화합물은 KAPAS를 저해하는 작용을 하고 있으며, 이들 화합물은 토양 및 경엽 처리에서 모두 비선택적으로 제초 활성을 나타내는 주요한 화합물일 것으로 판단할 수 있었다. 따라서 phthalimide계 화합물에 의한 KAPAS 전구물질의 축적 여부에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단하였다.

Table 3-4-8. KAPAS assay of phthalimide derivatives

Compound	IC ₅₀ (mM)						
K-1	0.42	K-31	-	K-61	0.74	K-91	-
K-2	2.37	K-32	0.76	K-62	-	K-92	-
K-3	1.31	K-33	0.86	K-63	0.58	K-93	-
K-4	-	K-34	-	K-64	-	K-94	-
K-5	-	K-35	1.01	K-65	0.13	K-95	-
K-6	-	K-36	1.27	K-66	0.89	K-96	-
K-7	0.86	K-37	-	K-67	0.44	K-97	-
K-8	-	K-38	1.22	K-68	0.51	K-98	-
K-9	1.94	K-39	-	K-69	0.36	K-99	1.25
K-10	0.59	K-40	-	K-70	0.50	K-100	0.72
K-11	1.62	K-41	0.78	K-71	1.08	K-101	1.04
K-12	-	K-42	-	K-72	-	K-102	1.16
K-13	1.69	K-43	0.76	K-73	0.30	K-103	0.50
K-14	1.24	K-44	-	K-74	0.61	K-104	-
K-15	-	K-45	-	K-75	-	K-105	0.85
K-16	1.24	K-46	0.97	K-76	-	K-106	1.29
K-17	1.54	K-47	1.19	K-77	-	K-107	0.71
K-18	2.87	K-48	0.92	K-78	-	K-108	0.98
K-19	-	K-49	-	K-79	-	K-109	0.70
K-20	1.47	K-50	1.85	K-80	-	K-110	0.86
K-21	1.26	K-51	-	K-81	-	K-111	1.38
K-22	-	K-52	-	K-82	0.98	K-112	-
K-23	1.56	K-53	1.28	K-83	-	K-113	-
K-24	1.29	K-54	2.03	K-84	1.05	K-114	-
K-25	0.67	K-55	-	K-85	-	K-115	0.49
K-26	-	K-56	-	K-86	-	K-116	0.75
K-27	1.13	K-57	1.13	K-87	-	K-117	-
K-28	-	K-58	0.76	K-88	-	K-118	-
K-29	0.97	K-59	1.47	K-89	-	K-119	-
K-30	-	K-60	0.67	K-90	-	K-120	-

Table 3-4-9. Herbicidal efficacy of newly synthetic phthalimide derivatives

Chemical name	Application	Control value (%)									
		SORBI	ECHCG	AGRSM	DIGSA	PANDI	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANSI	CAGEH
K-65	Pre	100	100	95	100	100	100	100	100	100	100
	Post	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100
K-69	Pre	100	30	30	100	100	100	100	100	90	100
	Post	100	100	40	100	100	100	100	100	100	100
K-73	Pre	70	70	30	100	100	80	30	20	20	100
	Post	90	95	50	90	100	100	100	100	100	100

* Application rate : 62.5 g a.i ha⁻¹

위탁시험설계서

1. 위탁시험 명 : 포장 적용시험
2. 위탁 기관 : 한국화학연구원
3. 시험 비용 : 일금 5,000,000원
4. 시험 기간 : 2005. 7. 1 ~ 2005. 9. 30
5. 시험책임자 : 농업과학기술원 농업생물부 잡초관리과장 박 재 읍
6. 시험 목적: 농림기술개발과제 “식물생존 필수효소 유전자 활용 환경친화형 신규 제초제 후보물질 개발”의 일환으로 포장에서 후보화합물의 제초활성 발현 유무 확인
7. 연구개발범위: 위탁자가 제시한 시험설계에 따른다.
8. 추진전략 및 방법: 농업과학기술원 표준시험법에 따라 시험을 실시하고 결과를 보고한다.
9. 지금까지의 연구개발실적: 국내 농약개발 및 등록에 관한 시험 수행 및 제반 과정에 대한 총괄 주관기관
10. 기대성과 및 활용방안: 신 물질을 개발하기 위해서는 신규 작용점의 발굴이 우선되어야 하는데 신규 작용점을 저해하는 후보 화합물의 포장 적용시험을 수행한다는 것은 신규성과 창조성이 매우 높다. 따라서 본 시험결과는 신규작용점 저해 신규 화합물의 유도체를 설계하거나 개발하는데 없어서는 안 될 자료로 활용될 것이다.
11. 시험설계서

시험항목: 약효 및 약해시험(잡초발생 후 경엽처리에 의한 제초활성 평가)

시험방법:

- 표면적 $4m^2(2x2m)$ 의 3반복 야외 시험포장으로 수행하며, 약제 처리전 잡초발생밀도를 조사한다(importance value).
- 시험화합물의 처리 후 잡초방제효과를 경시적으로 조사 한다(약제 처리 전후의 제초증상 및 효과, 포장전경 등의 사진촬영).
- 최종적으로 약제처리 28일 후 발생된 잡초에 대한 방제가를 조사 한다(잔존 잡초의 종류별 생체중 기준 방제가 산출).

약제조제:

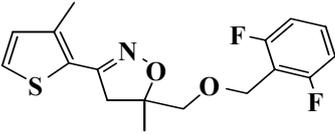
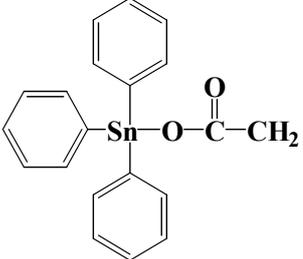
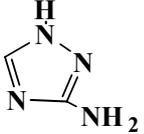
- 시험약제는 3중(3농도)으로 다음<구조 및 처리농도>과 같다.
- Code No. KRICT-001, KRICT-002, KRICT-003으로 표기한다.
- 모든 약제의 원제를 acetone/tween(50%/1%)에 녹인 후 경엽에 분무 살포한다.

시험포장 관리:

- 발생 잡초의 종류가 다양하면서 균일하게 분포된 포장을 선정한다.
- 시험 기간동안 집중강우(장마) 또는 가뭄에 대한 대책을 강구한다.

기타사항: 처리농도 및 화합물은 위탁자와 농과원의 합의를 통하여 변경할 수 있으며, 기타 사항은 관행에 준하여 수행한다.

구조 및 처리농도

Code No	구 조	처리농도	비고
KRICT 001		600, 300, 150 g/ha	Isoxazole (5229)
KRICT 002		600, 300, 150 g/ha	Triphenyltin acetate
KRICT 003		600, 300, 150 g/ha	3-amino-1,2,4- triazole

농업과학기술원

수신자 한국화학연구원장
(경유)

제목 2004년 농림기술개발사업 위탁연구과제 보고서 제출

1. 관련 : 한국화학연구원 연관 200-1657(2004.12.08)
2. 위관련호에 의해 아래와 같이 계약된 2004년 농림기술개발사업 위탁연구과제 포장시험 보고서를 불임과 같이 제출합니다.

- 아 래 -

위탁연구기관 및 책임자	위탁연구과제명	연구비 (단위:천원)	연구기간	연구책임자
농업과학기술원/ 박재읍	포장시험	5,000	2004.10.15- 2005.10.14 (1년)	황인택

불임 포장시험 보고서 1부. 끝

농업과학기술원장



농업연구사 이인용

잠초관리과장 박재읍

11/01
농업생물부장 류강선

협조자

시행 잠초관리과-690 (2005.11.02.) 접수

우 경기도 수원시 권선구 서문동 249

/ www.niast.go.kr

전화 031-290-6480 전승 031-290-6486 / leeinyong@rda.go.kr

/ 공개

"새기술 지식농업 세계속의 한국농업"

포장시험 보고서

1. 시험목적

농림기술개발과제 "식물생존 필수요소 유전자 활용 환경친화형 신규 제초제 후보물질 개발"의 추진 내용으로 포장에서 후보화학물의 제초활성 발현 유무를 확인하고자 함

2. 대상약제 : KRICT-001, KRICT-002, KRICT-003 등 3약제

- 처리약량 : 약제별 600, 300, 150g/ha

3. 대상잡초 및 처리방법

- 대상잡초 : 밭 일년생잡초
- 처리방법 : 잡초발생 후 경엽처리

4. 약제처리

- 공시 약제인수 : 2005년 8월 18일
- 포장조성 : 2005년 8월 22일
- 약제처리 : 2005년 10월 10일
 - * 강우가 계속 되고 기온이 낮은 관계로 경엽처리할 정도의 잡초발생량이 안되었음
- 약제처리 당시 잡초발생 정도
 - 발생초종 : 쇠비름, 왕바랭이, 바랭이, 피, 비름, 황새냉이, 속속이풀, 명아주, 깨풀, 방동사니, 까마중, 포아풀, 뚝새풀, 얼치기완두 등 20초종
 - 처리당시 생육정도

잡 초 명	엽 수	잡 초 명	엽 수
피	4-5엽	속속이풀	5-6엽
바랭이	3-4엽	깨 풀	6-7엽
왕바랭이	분얼 15엽	까 마 중	5-7엽
뚝 새 풀	4-5엽	개 비 름	5-7엽
명 아 주	5-7엽	쇠 비 름	5-7엽

- 약제당시 잡초 우점도

잡 초 명	우 점 도(%)	잡 초 명	우 점 도(%)
쇠 비 림	13.8	한 련 초	4.4
속 속 이 풀	12.7	개 비 림	4.2
뚝 새 풀	9.6	흰 명 아 주	3.6
피	7.7	바 령 이	3.6
왕 바 령 이	5.8	차 풀	3.3
개 풀	4.7	중 태 가 리 풀	3.1

5. 약제처리 결과

○ 달관방제효과

약 제 명	시기별 방제효과(%)			비 고
	7 DAT	10 DAT	14 DAT	
KRICT-001	0	10	30	황화현상을 보였으나 고사시키지는 못하였음
KRICT-002	0	10	30	바랭이 등 화분과잡초만 신초생육을 억제시킴
KRICT-003	20	50	85	백화현상을 유발하여 잡초고사, 배추에 약해발생

○ 약제특성

처리약제	약 제 특 성
KRICT-001	<ul style="list-style-type: none"> ○ 화분과잡초의 염색이 얇게 황화현상을 보이거나 고사까지는 진전되지 못하였음 - 일부 피는 신초가 죽음 ○ 광엽잡초는 별다른 증상없음
KRICT-002	<ul style="list-style-type: none"> ○ 일부 바랭이만 기저부 등에 적갈색의 반점이 보였으나 고사까지는 진전되지 못하였음 ○ 광엽잡초는 별다른 증상없음
KRICT-003	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물 및 잡초전체가 백화현상 발생되어 잎이 죽음 - 기존의 clomazone 제초제와 증상이 유사 - 농도간에 백화현상의 차이없음 ○ 배추포기 중 일부 잎에 약액이 묻으면 처음에는 파라코액제 피해와 유사하나 전이되어 다른 부위도 백화현상 유발

6. 포장시험 결과 요약

- 대상약제를 2005년 8월 18일에 인수하는 관계로 약제처리 시기가 늦어 주로 밭에서 발생하는 하계잡초 중 월동잡초를 대상으로 시험을 수행하였음
- 밭 일년생잡초를 대상으로 하여 약제처리한 결과, KRICT-001, 002는 처리 약량에 관계없이 바랭이, 피 등 화본과잡초에 대해 신초생장억제효과를 보였으나 완전히 고사시키지는 못하였고 광엽잡초에 대해서는 약제반응을 관찰할 수 없었음. KRICT-003는 처리약량에 관계없이 백화현상이 일어나 바랭이, 피 등의 화본과잡초와 쇠비름 등의 광엽잡초를 방제하였으나 인근 작물(배추)에 약해(백화)가 발생되어 대상작물 선정에 신중할 필요가 있음
- 추후 작물에 대한 약해발생 여부를 정밀히 검토할 필요가 있음



실험포장 전경



Control



14DAT-001-600g



14DAT-002-600g



14DAT-003-600g

포장시험약제의 살초증상

이상과 같은 일련의 연구개발방법 및 설계는 세계적으로 처음 수행하는 것이기 때문에 상황에 따라 다소간 변화될 수 있으며, 신규 제초제가 개발되는 데에는 최소 10년 이상 필요하다는 것은 교과서적인 사실이므로 제초활성 신규물질의 발굴과 이의 확인까지가 본 과제의 최종 목적인 것이다.

따라서 지금까지의 결과를 기본으로 하여 출발하는 연구를 위하여 추가적인 지원이 필요하며, 지속적인 연구수행을 통하여 새로운 국산 신규 제초제가 개발되어야 할 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 대한 기여도

제 1절 목표 달성도

구 분	연구 개발 목표	목표달성도
1차 년도 (2002)	- Antisense 기법을 활용한 식물 기능성 유전체 연구 - 작용점 선정 및 저해물질 검색체제 구축	100
2차 년도 (2003)	- 신규 제초제 타겟 유전자에 대한 분자생물학적 분석 - 신규 제초제 후보 화합물 탐색 및 약효검색(스크리닝)	100
3차 년도 (2004)	- 타겟 유전자의 기능 동정 - Target-directed synthesis를 통한 후보 화합물 생산 및 최적화연구	100

연구개발내용:

- 1) Antisense 기법을 활용한 식물 기능성 유전체 연구를 위하여 120여개의 식물 성장 필수효소에 대한 정보를 각종 문헌을 통하여 13개의 후보를 선발하였고, 선발된 후보들에 대한 유전정보를 BLAST, TAIR 등의 *Arabidopsis* D/B를 통하여 신규 작용점 후보를 도출하였다. 이들 중 7-keto-8-amino pelagonic acid synthase(KAPAS)와 cinnamylalcohol dehydrogenase(CAD) 후보유전자의 gene sequence를 확인하고 antisense construct를 제작하였고 적합한 vector와 promotor 및 primer를 제작하여 *Arabidopsis*로 형질 전환시켰다. 형질전환 시킨 식물체로부터 T1 종자를 확보하여 이들에 대한 lethality를 확인하였다. 이들 중 lethality를 나타내는 유전자 발현단백질을 신규작용점으로 확정(식물 성장 필수효소)하였다.
- 2) 작용점 선정 및 저해물질 검색체제 구축을 위하여 선정된 목표 유전자를 *E. coli*로 형질 전환시켜 배양하면서 단백질을 대량 발현시켰고, 발현시킨 단백질을 분리 정제하여 단백질(효소)활성 측정방법 개발하였다. 효소활성을 측정하기 위하여 필요한 기질(pimelyo CoA, DAPA) 및 중간체를 합성하였고, 확립된 효소활성측정방법을 간편화시켜 고속약효검색체제로 전환하여 화합물은행이 보유하고 있는 45,000여개의 화합물을 대상으로 hit(활성물질)를 발굴하였다. 발굴된 hit 중 일부에 대해서는 lead 화합물을 합성하였다.
- 3) 추가적으로 D/B를 통한 신규 작용점 AtCAD(신나밀 알콜 탈수소화 효소기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도, 출원번호:

2004-0013086)를 발굴하여 유전자 분리, 단백질의 발현유도, antisense gene으로 형질전환된 식물체의 표현형 검정 등을 통하여 특허출원하였다.

4) tKAPAS와 AtCAD에 대한 고속약효검색체제를 확립하여 AtCAD에 대해서는 화합물은행이 보유하고 있는 45,000개의 화합물에 대한 검정을 완료하여 10개의 hit를 발굴하였고, 기타 구매화합물 중에서 5개의 hit를 발굴하였다. 이들에 대해서는 유도체 일부를 합성하여 구조-활성을 검토하였으며, *in vivo* test를 실시하여 *in vitro*와 *in vivo* 실험 결과를 검토하였다.

5) *In vitro*시험을 통하여 선발된 후보화합물의 *in vivo*시험(greenhouse) 결과를 토대로 하여 유망한 후보화합물의 포장시험(위탁시험)을 수행하였다.

이상과 같이 당초 계획하였던 3년차 연구개발 목표를 모두 달성 하였지만 아직까지는 후보화합물의 수준에 머물고 있기 때문에 추가적인 연구 지원을 통하여 제품으로 탄생되어야 할 것이다.

제 2절 관련분야에 대한 기여도

- 본 기술의 중점사항은 유전 단백질 및 functional gene 기원에 의한 신규 작용점 탐색, 목표 지향적 신규 식물기능 조절 후보화합물 탐색기술 개발, target-directed synthesis를 통한 후보 화합물 생산, 화합물은행과 high throughput screening(HTS)을 통하여 유해생물의 기능조절 on-off 스위치 역할을 담당하는 세포의 성장 및 사멸 조절물질을 개발, 실제 작물에 대한 적용방법 및 작용기전 연구(저항성 작물 개발 등)로 이어지기 때문에 국내 화학 및 생물산업의 공통 애로기술인 biotechnology를 이용하는 효능평가 Infra structure 구축으로 신기업창출 유도 및 환경조화형 작물보호제의 개발을 선도하게 될 것임.
- 특히 신규 작용점을 발굴함으로써 인하여 세계적으로 특허 출원된 28개의 5%이상 점유하게 되어 세계적인 기술수준으로 도약발전하게 되었고, 이를 토대로 하여 새로운 제초제가 개발된다면 명실 공히 생물화학 선진국의 대열로 진입하게 될 것임.
- 본 과제 수행을 통하여 식물 유전체학, 식물 단백질학, 조합화학, 고효율약효검색, 구조결정학, 분자모델링 등의 핵심기반 기술을 확립하는데 크게 기여하였음.
- 신규 제초제 개발은 식량안보의 차원에서 식량생산성 향상을 위한 작물보호

약품으로서의 기능과 15조원 세계시장을 공략할 수 있는 정밀화학 전략사업으로서의 기능을 동시에 가지고 있다. 따라서 세계적인 차세대 중점사업의 일환으로 사람과 동물에 대한 독성이 낮고, 환경보존에 대한 중요성이 강조되는 현실에 알맞은 신규 제초제 개발에 동참할 수 있는 기반을 구축하였다.

- 인체에 대한 유전체 연구는 물론 식물에 대한 유전체 연구에서도 창의적 과학 기술이 인간의 삶에 유용하게 이용되게 하기 위해서는 유전자지도가 작성되고, 기능을 확인하여 목적에 알맞게 조절할 수 있어야 한다. 따라서 기능을 조절할 수 있는 각종 화학물질의 개발이 유전공학의 최종산물이 될 것이다.
- 지금처럼 유전체 연구가 활발하게 진행되지 않았던 과거에는 이러한 분야의 연구가 불가능하였지만, 수많은 유전정보가 제공될 미래에는 유전자의 기능을 파악하고 조절하는 분야가 어떠한 분야보다 활발하게 연구될 것이다.
- 이와 같은 상황에서 유전정보를 활용하여 신규 제초제를 개발한다는 것은 세계적으로 앞서가는 기술이며, 무한한 가치를 창조하는 것이다. 앞으로는 식물체에만 존재하면서 환경 친화적인 신규 식물기능 조절물질과 제초제만이 세계적인 시장을 확보 할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 연구개발결과

<국제특허출원>

번호	특허 제목		
	출원일	출원국	출원번호
1	Polypeptide having function of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a polynucleotide coding the polypeptide and those uses.		
	2005/02/18	PCT	PCT/KR2005/000454
2	Polypeptide participating in pyridoxine biosynthesis, a polynucleotide coding the polypeptide and those uses.		
	2005/02/18	PCT	PCT/KR2005/000453
3	Novel polypeptide having function of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase of plant and method for inducing growth inhibition and lethality by suppressing expression of the polypeptide		
	2003/07/02	EPO	03738731.3
	2004/12/30	USA	추후통지
	2003/07/02	PCT	PCT/KR2003/001301

<국내특허출원>

번호	특허 제목		
	출원일	출원국	출원번호
1	피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드		
	2004/02/20	한국	2004-0011517
2	신나밀 알콜 탈수소화 효소기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도		
	2004/02/26	한국	2004-0013086
3	피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도		
	2005/02/01	한국	2005-0008970

<국제 학술논문>

번호	논문 제목	
	게재일	게재지
1	Protoporphyrinogen IX-oxidizing Activities involved in the Mode of Action of a New Compound <i>N</i> -[4-Chloro-2-fluoro-5-{3-(2-fluorophenyl)-5-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-ylmethoxy]-phenyl]-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide	
	2004/01/30	Pesticide Biochem. & Physiol., 80, 123 ~ 130
2	New 2-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole derivatives as paddy field herbicides	
	2005/03/30	Pest Management Science, 61, 483 ~ 490
3	EK-2612, a new cyclohexane-1,3-dione possessing selectivity between rice (<i>Oryza sativa</i>) and barnyardgrass (<i>Echinochloa crus-galli</i>)	
	2004/01/30	Pest Management Science, 60, 909 ~ 913

<국내 학술논문>

번호	논문 제목	
	게재일	게재지
1	Synthesis and herbicidal activities of cyclic imide derivatives substituted with epoxy groups	
	2005/06/30	한국농약과학회지 9권 2호 181 ~ 184
2	New method for the synthesis of 3-chloro-2-(4-chloro-2-fluoro-5-hydroxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole	
	2005/03/30	한국농약과학회지 9권 1호 23 ~ 25
3	신규 제초제 후보 화합물 EK-5439의 선택성 및 토양 중 행동특성	
	2004/09/30	한국농약과학회지 8권 3호 175 ~ 183
4	신규 화합물 EK-5439의 선택성 및 protophorphyrinogen oxidase 저해활성	
	2004/06/30	한국농약과학회지 8권 2호 79 ~ 87
5	새로운 9-(5-isoxazolemethoxyphenyl)imino-8-thia-1,6-diazabicyclononan-7-one 유도체의 합성과 제초활성	
	2003/12/30	한국농약과학회지 7권 4호 310 ~ 313
6	식물생존 필수효소 유전자활용 신규 제초제 작용점 탐색	
	2003/9/30	한국잡초학회지 23권 3호 179 ~ 189

<국내외 학술발표>

번호	논문 제목	
	발표 일	학회 명
1	신규 제초작용점 7-keto-8-aminopelagonic acid synthetase (KAPAS) 발굴 및 저해제 탐색	
	2005/10	한국농약과학회
2	신규 제초제 작용점 Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD) 발굴 및 저해제 탐색	
	2004/10	한국농약과학회
3	Protoporphyrinogen IX-oxidizing Activities involved in the Mode of Action of a New Compound EK-5385	
	2004/10	한국농약과학회
4	Synthesis and Herbicidal Properties of 5-Benzyloxymethyl-1,2- isoxazoline Derivatives	
	2004/10	한국농약과학회
5	Characteristics of 7-keto-8-aminopelagonic acid synthase as a novel herbicide target.	
	2003/10	한국농약과학회
6	식물생존 필수효소 유전자활용 신규 제초제 작용점 탐색	
	2003/10	한국잡초학회
7	Characterization of a gene encoding 7-keto-8-aminopelagonic acid synthase in <i>Arabidopsis thaliana</i> , and its potential as a novel herbicide target.	
	2003/7	Asian-Pacific Weed Science Society

제 2절 활용계획

- ▶ 지금까지 개발되지 않은 작용점을 대상으로 신규 제초제를 개발할 경우 세계적인 제초제 시장에 진입하게 될 것이며, 비선택성 제초제를 개발할 경우 제초제 저항성 작물(예: Round-Up Ready 콩)을 개발하는데 직접 활용가능
- ▶ 동일한 추진체계와 기술을 통하여 각종 식물생장조절물질을 개발할 수 있으며, 기존의 제초제로서 방제하기 어려운 저항성 잡초의 방제, 기능성 작물의 생산 및 조절 등에 활용할 수 있음.

- ▶ 환경친화적이며 강력한 제초활성 물질을 탐색하게 되면 신규 제초제로 개발하기 위하여 국내는 물론 세계적인 기업들이 경쟁적으로 licensing 을 요구하게 될 것임.
- ▶ 그러나 국내 기업이 영세하고, 세계적인 기업들로부터 원제를 수입하고 있기 때문에 국내기업에 의한 자체개발과 해외시장 확보는 매우 어려움.
- ▶ 따라서 국내와 동남아를 우리의 시장으로 하는 조건으로 licensing out 을 하여 신규 제초제로 개발할 수 있도록 해야 할 것임.
- ▶ 비선택성 제초제로 개발할 경우에는 제초제 저항성 작물의 개발을 위하여 새로운 연구단이 형성되어야 할 것임.
- ▶ 또한 국가적인 차원에서 신 물질을 보호하고, 정책적으로 연구개발을 지원하여야 할 것임.

제 6 장 해외과학기술정보

제 1절 기존 작용점에 대한 특허분석자료

2005년도까지 미국, 일본, 유럽에 수록된 제초제 신규 작용점에 대한 특허를 조사한 결과 8개 효소/작용점에 대한 특허는 모두 270건이었다. 이들 중에서 PPO에 대한 특허가 65건으로 가장 많았으며, ALS에 대한 특허가 59건, EPSPS에 대한 특허가 47건, GS에 대한 특허가 46건, ACCase에 대한 특허가 27건, PDS에 대한 특허가 18건, DHP에 대한 특허가 5건으로 나타났다(Fig. 6-1).

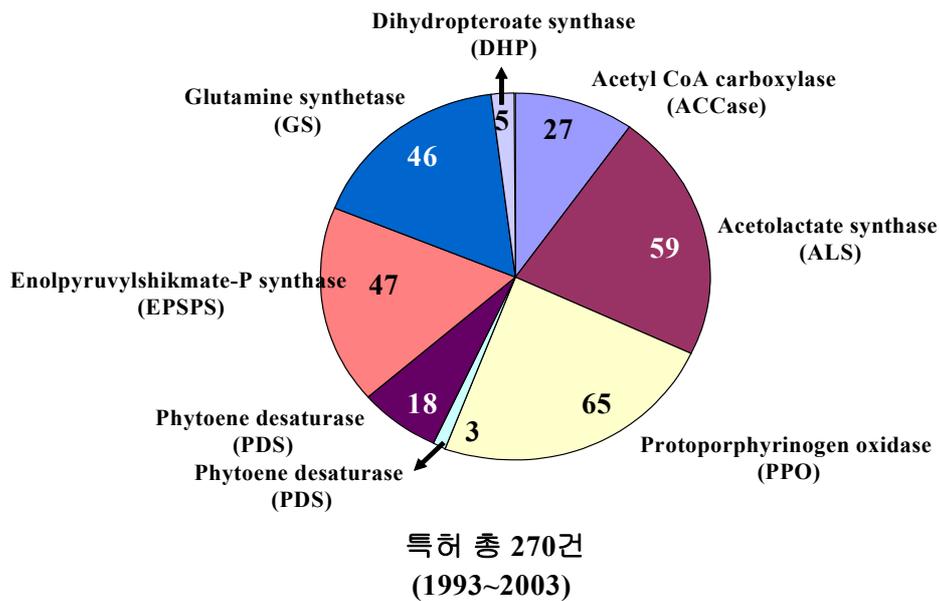


Fig. 6-1. Patents analysis for herbicide targets.

이들 중 ACCase에 대한 미국특허 총 20건 중 11건이 유전자 특허이며 4건이 형질전환 기술, 기타 저항성 작물, 방제기술, 약해경감제, 혼합제, Promoter가 각 1건씩 검색되었다. ACCase에 대한 유럽특허 총 7건 중 4건이 유전자에 관한 것이었으며, 저항성 작물, 약해경감제, 혼합제가 각각 1개씩 검색되었다(Table 6-1).

ALS에 대한 미국특허 총 37건 중 9건이 유전자 특허이며 형질전환 기술 4건, 저항성 작물 8건, 약해경감제 5건, 혼합제 4건, 검색기술 2건이 검색되었고 추가적으로 신규제초제, 작용점탐색, Promoter, Marker, 저항성잡초 선별기술 등이 각각 1건씩 검색되었다(Table 6-2). ALS에 대한 유럽특허 총 19건 중 5건이 유전자에

관한 것이었으며, 저항성 작물 1건, 혼합제 7건, 환경정화 1건, 신규제초제 4건, 검색기술 1건 등이었다. ALS에 대한 일본특허는 혼합제 2건과 신규제초제에 관한 1건 이었다.

DHP에 대한 미국특허 총 4건 중 2건은 유전자, 1건은 저항성작물, 1건은 혼합제에 관련된 내용이었다. DHP에 대한 유럽특허 총 1건은 미국특허 5633444와 동일한 것이었다(Table 6-3).

EPSPS에 대한 미국특허 총 37건 중 15건이 유전자 특허이며 형질전환 기술 6건, 저항성 작물 4건, 약해경감제 및 혼합제 4건, Promoter 8건으로 검색되었다(Table 6-4). EPSPS에 대한 유럽특허 총 8건 중 4건이 유전자에 관한 것이었으며, 저항성 작물 3건, 분석기술 1건 등이었다. EPSPS에 대한 일본특허는 유전자에 대한 2건이었다.

GS에 대한 미국특허 총 26건 중 2건이 유전자 특허이며 형질전환 작물 및 기술 13건, 형질전환체 1건, 저항성 작물 3건, 저항성세포 1건, Promoter 1건, 혼합제 2건, 재배기술 2건, 검색기술 1건으로 검색되었다(Table 6-5). GS에 대한 유럽특허 총 14건 중 유전자 1건, 저항성작물 2건, 저항성세포 5건, 형질전환체 2건, 형질전환기술 2건, 검색기술 1건, 재배기술 1건 등이었다. GS에 대한 일본특허 6건 중에는 유전자 4건, 합성기술 및 검색기술 등이 각각 1건이었다.

HPPD에 대한 미국특허 총 9건 중 4건이 유전자 특허이며 약해경감제 1건과 탐색기술 3건, Promoter 1건이 검색되었다(Table 6-6). HPPD에 대한 유럽특허 총 9건 중 유전자 6건, 약해경감제, 탐색기술, 제제기술 등이 각각 1건 이었다.

PDS에 대한 미국특허 1건은 저항성에 관한 것이었으며, 일본특허 2건은 탐색기술과 저항성작물에 관한 것이었다(Table 6-7).

PPO에 대한 미국특허 총 54건 중 36건이 저항성 작물이며 6건의 방제 및 제제 기술, 5건의 혼합제, Promoter 1건, 효소생산증대기술 2건이 검색되었다(Table 6-8). PPO에 대한 유럽특허 총 10건 중 유전자 3건, 제제기술 2건, 암치료기술 1건, 효소생산증대기술 1건, 저항성작물개발기술 1건, Promoter 1건, 혼합제 1건 등으로 검색되었다. PPO에 대한 일본특허 2건 중에는 유전자 1건, 저항성 작물 1건이었다.

Table 6-1. Patents analysis for ACCase inhibiting herbicides

App. No		Reg. No		Contents	
미국					
1	422560	5910626	Acetyl-CoA carboxylase compositions and methods of use.		유전자
2	244537	5854420	Maize acetyl CoA carboxylase encoding DNA clones.		유전자
3	956700	5539092	Cyanobacterial and plant acetyl-CoA carboxylase.		유전자
4	934386	6306636	Nucleic acid segments encoding wheat acetyl-CoA carboxylase.		유전자
5	485607	5792627	Cyanobacterial and plant acetyl-CoA carboxylase.		유전자
6	611107	5801233	Nucleic acid compositions encoding acetyl-coa carboxylase and uses therefor.		유전자
7	475879	5972644	Cyanobacterial and plant acetyl-CoA carboxylase.		유전자
8	418893	5559220	Gene encoding acetyl-coenzyme A carboxylase.		유전자
9	468793	6177267	Acetyl-CoA carboxylase from wheat.		유전자
10	433043	6399342	Cyanobacterial and plant acetyl-CoA carboxylase.		유전자
11	476537	5756290	Cyanobacterial and plant acetyl-CoA carboxylase.		유전자
1	917462	5290696	Method for imparting cyclohexanedione and/or aryloxyphenoxy propionic acid herbicide tolerance to maize plants.		형질 전환기술
2	417089	6069298	Methods and an acetyl CoA carboxylase gene for conferring herbicide tolerance and an alteration in oil content of plants.		형질 전환기술
3	695651	6146867	Methods for expressing a maize acetyl CoA carboxylase gene in host cells and encoded protein produced thereby.		형질 전환기술
4	14326	5498544	Method and an acetyl CoA carboxylase gene for conferring herbicide tolerance.		형질 전환기술
1	538674	5162602	Corn plants tolerant to sethoxydim and haloxyfop herbicides.		저항성 작물
1	179946	5428001	Method for combating weeds among maize plants.		방제 기술
1	484562	6281168	Herbicidal compositions and method of safening herbicides using benzothiazole derivatives.		약해 경감제
1	264775	6239072	Tank mixtures and premixtures for weed control programs that include postmergence applications of glyphosate plus graminicides in glyphosate tolerant soybeans.		혼합제
1	735545	6025131	Facile method for identifying regulated promoters.		promoter

유럽					
1	9292393	615547	Maize acetyl CoA carboxylase encoding DNA clones.		유전자
2	9691272	820514	Acetyl CoA carboxylase compositions and		유전자

			methods of use.	
3	9392318	663012	Cyanobacterial and plant acetyl CoA carboxylase.	유전자
4	9490566	680511	Acetyl CoA carboxylase gene.	유전자
1	9691256	820513	Transgenic plants expressing Acetyl CoA carboxylase gene.	저항성 작물
1	300301.9	1021953	Herbicidal compositions and method of safening herbicides using benzothiazole derivatives.	약해 경감제
1	3011111.6	1348336	Mixtures for weed control in glyphosate tolerant soybeans.	혼합제

Table 6-2. Patents analysis ALS inhibiting herbicides

App. No	Reg. No	Contents		
미국				
1	362022	5605011	Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase.	유전자
2	564109	6018103	Chimeric plant genes possessing independent regulatory sequences.	유전자
3	984151	6130366	Chimaeric gene coding for a transit peptide and a heterologous polypeptide.	유전자
4	164360	5013659	Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase.	유전자
5	892305	5378824	Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase.	유전자
6	137478	6225105	Mutant acetolactate synthase gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> for conferring imidazolinone resistance to crop plants.	유전자
7	642976	5141870	Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase.	유전자
8	363208	5767366	Mutant acetolactate synthase gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> for conferring imidazolinone resistance to crop plants.	유전자
9	321356	5633437	Gene exhibiting resistance to acetolactate synthase inhibitor herbicides	유전자
1	416450	6297056	Brassica transformation via microprojectile bombardment.	형질 전환 기술
2	389389	5717129	Methods for maintaining sterility in plants.	형질 전환 기술
3	687550	5283184	Genetic engineering of novel plant phenotypes.	형질 전환 기술
4	501076	5231020	Genetic engineering of novel plant phenotypes.	형질 전환 기술
1	747099	4774381	Herbicide resistant tobacco.	저항성 작물
2	533497	5198599	Sulfonylurea herbicide resistance in plants.	저항성 작물
3	813788	6376754	Plants having resistance to multiple herbicides and its use.	저항성 작물

4	761197	5859348	Imidazolinone and sulfonyl urea herbicide resistant sugar beet plants.	저항성 작물
5	783030	5808174	Maize resistant to aryloxyphenoxyalkanecarboxylic acid herbicides.	저항성 작물
6	682303	5773702	Imidazolinone herbicide resistant sugar beet plants.	저항성 작물
7	414449	RE3566 ₁	Sulfonylurea herbicide resistance in plants.	저항성 작물
8	796152	5262316	Genetically transformed pepper plants and methods for their production.	저항성 작물
1	452456	5614466	Herbicidal compositions comprising a growth regulating herbicide to safen imidazolinone herbicides.	약해 경감제
2	351863	5739080	Safened herbicidal compositions comprising a phytotoxicity reducing phenoxy acid herbicide and a sulfonylurea, sulfonamide, or imidazolinone herbicide.	약해 경감제
3	353410	6235682	Compositions and methods for protecting cultivated plants from herbicidal injury.	약해 경감제
4	461443	5698539	Mixtures of herbicides and antidotes, (hetero)-aryloxy compounds, their preparation, compositions containing them, and their use.	약해 경감제
5	866654	5846902	Safened sulfonamide herbicidal compositions.	약해 경감제
1	684408	5084086	Herbicide utility on resistant crops.	혼합제
2	938370	6683027	Herbicidal mixtures.	혼합제
3	396372	6034034	Process and composition for controlling weeds.	혼합제
4	452166	5612284	Herbicidal compositions comprising a growth regulating herbicide to safen sulfonylurea herbicides.	혼합제
1	568197	6214769	Herbicidal N-[(1,3,5-triazin-2-yl)-aminocarbonyl]-benzene sulfonamides.	신규 제조제
1	633274	6833494	Regulation of lethal gene expression in plants.	작용점 탐색
1	735545	6025131	Facile method for identifying regulated promoters.	Promoter
1	583337	4626505	Selectable markers for yeast transformation.	Marker
1	692059	RE3617 ₅	Methods for detecting acetohydroxyacid synthase inhibitors.	검색기술
2	635013	5206135	Use of the oxygenase activity of acetolactate synthase for herbicide detection.	검색기술
1	37961	5932434	Method for identifying weeds resistant to inhibitors of acetolactate synthase.	저항성 잡초 선별기술
일본				
1	200200619 ₂₂	2002033 ₂₂₀₁	Herbicidal composition.	혼합제
2	200102084 ₂₃	2003002 ₆₅₁₈	Herbicidal composition for paddy field.	혼합제

3	199400078 24	1995014 9735	Pyrimidinyl oxybenzoic acid derivative, its production, and use thereof as herbicide.	신규 제초제
유럽				
1	8730738	257993	Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase.	유전자
2	9893368	920520	Nucleotide sequence coding for an enzyme having a acetolactate synthase activity, plant cell and plant containing it, and method for weeding plants.	유전자
3	1982810	1347056	Gene encoding acetolactic acid synthase gene.	유전자
4	9610541	730030	Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase.	유전자
5	2760304	1414982	DNA molecules encoding herbicide tolerant acetolactate synthase.	유전자
1	9191991	557352	Herbicide resistant plants.	저항성 작물
1	9212125	547546	Combination of ALS-regulators, insecticides and safeners, method of preparation and use as plant protection agent.	혼합제
2	9292278	580819	Herbicide utility on resistant crops.	혼합제
3	4013341	1468609	Combinations of sulfonyl urea herbicides and safeners.	혼합제
4	2026752	1290946	Herbicidal composition.	혼합제
5	2026751	1290944	Herbicidal composition.	혼합제
6	2026751	1290945	Herbicidal composition.	혼합제
7	1101799	1093722	Liquid herbicidal agent.	혼합제
1	99250333	989098	Bacterial strain <i>Comamonas testosteroni</i> MC1 and process for the microbial decontamination of materials polluted with phenoxyacetic acid herbicides.	환경정화
1	1107593	1116717	Substituted 3-phenylpyrazoles as herbicides.	신규 제초제
2	4013876	1481970	Novel herbicides.	신규 제초제
3	1110137	1120411	4-Aryl-1,2,4-triazolidinedione derivatives and their use as herbicides.	신규 제초제
4	8481054	143078	Neue Phosphorverbindungen als Wirkstoffe zum Schzen von Kulturpflanzen vor der phytotoxischen Wirkung von Herbiziden.	신규 제초제
1	1115693	1174517	Use of Very Long Chain Fatty Acid Elongase for the identification of herbicides.	검색기술

Table 6-3. Patents analysis DHP inhibiting herbicides

App. No	Reg. No	Contents	
미국			
1	444420	5633444	Sulfonamide resistance genes and their use. 유전자

2	444718	5719046	Sulfonamide resistance genes and their use.	유전자
3	347975	6121513	Sulfonamide resistance in plants.	저항성 작물
4	938370	6683027	Herbicidal mixtures.	혼합제
유럽				
1	8931126	369637	Sulfonamide resistance genes and their use.	유전자

Table 6-4. Patents analysis EPSPS inhibiting herbicides

App. No		Reg. No		Contents	
미국					
1	306063	5633435	Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases		유전자
2	25082	RE36449	Chimeric gene for the transformation of plants		유전자
3	62	6338961	Isolated DNA sequence capable of serving as regulatory element in a chimeric gene which can be used for the transformation of plants		유전자
4	564109	6018103	Chimeric plant genes possessing independent regulatory sequences		유전자
5	477581	5633448	Chimeric gene for the transformation of plants		유전자
6	984151	6130366	Chimaeric gene coding for a transit peptide and a heterologous polypeptide		유전자
7	25042	RE37287	Chimeric gene for the transformation of plants		유전자
8	251621	5510471	Chimeric gene for the transformation of plants		유전자
9	137440	6248876	Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases		유전자
10	833485	5804425	Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases		유전자
11	591407	5932479	Genetic engineering of plant chloroplasts		유전자
12	476008	5627061	Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases		유전자
13	945144	6566587	Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene		유전자
14	465609	5866784	Recombinant plant expressing non-competitively binding insecticidal crystal proteins		해충기피 유전자
15	463240	5908970	Recombinant plant expressing non-competitively binding Bt insecticidal crystal proteins		해충기피 유전자
1	351123	6492578	Expression of herbicide tolerance genes in plant plastids		형질전환
2	269701	5639951	Doubled haploids		형질전환 기술
3	80625	6307123	Methods and compositions for transgene identification		형질전환 기술
4	56073	5914451	Efficiency soybean transformation protocol		형질전환 기술

5	389389	5717129	Methods for maintaining sterility in plants	형질전환 기술
6	737698	6462258	Plant expression constructs	형질전환 기술
1	800130	6803501	Methods for making plants tolerant to glyphosate and compositions thereof using a DNA encoding an EPSPS enzyme from <i>Eleusine indica</i>	저항성 작물
2	813788	6376754	Plants having resistance to multiple herbicides and its use	저항성 작물
3	697808	4769061	Inhibition resistant 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthase, production and use	저항성 작물
4	719841	5866763	Inbred corn line ZS01220	저항성 작물
1	39046	6331660	Maize DIMBOA biosynthesis genes	약해 경감제
1	938370	6683027	Herbicidal mixtures	혼합제
2	719429	6534444	Herbicidal mixtures having a synergistic effect	혼합제
3	101330	6096686	Use of glyphosate salts in seed dressing herbicidal compositions	혼합제
1	37531	6750378	Maize H3C4 promoter combined with the first intron of rice actin, chimeric gene comprising it and transformed plant	promoter
2	312038	6232526	Maize A3 promoter and methods for use thereof	promoter
3	312285	6194636	Maize RS324 promoter and methods for use thereof	promoter
4	695782	6433252	Maize L3 oleosin promoter	promoter
5	113690	6271444	Enhancer elements for increased translation in plant plastids	promoter
6	532806	6747189	Maize glycine rich protein promoter compositions and methods for use thereof	promoter
7	312304	6429357	Rice actin 2 promoter and intron and methods for use thereof	promoter
8	312266	6207879	Maize RS81 promoter and methods for use thereof	promoter
유럽				
1	9191709	546090	Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases	유전자
2	9793287	937154	Chimera gene with several herbicide resistant genes, plant cell and plant resistant to several herbicides.	유전자
3	9810234	924299	Transit peptide DNA sequence	유전자
4	9242006	508909	Chimeric gene for the transformation of plants	유전자
1	1130565	1217073	Transformed plants with improved tolerance to phosphomethylglycine family herbicides containing a gene encoding a mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	저항성 작물
2	1202315	1167531	Corn transformant PV-ZMGT32 (NK603) and	저항성

			compositions and methods for detection thereof	작물
3	9791055	946737	Herbicide resistant plants	저항성 작물
1	302765.3	1043402	Assays for the determination of pesticidal damage, resistance, and pesticide mode of action	분석기술
일본				
1	20000345 384	2001019 7841	Glyphosate resistant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases	유전자
2	19880128 134	1989003 9984	Glyphosate tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases	유전자

Table 6-5. Patents analysis GS inhibiting herbicides

App. No	Reg. No	Contents		
미국				
1	837625	6335008	Hybrid genes incorporating a DNA fragment containing at least one gene encoding an insecticidal protein and a gene encoding a glutamine synthase inhibitor, plasmids, transformed cyanobacteria expressing such proteins and method for use as biocontrol agent	유전자
2	620167	4605165	Constant rate volatile composition dispensing article and process for using same	유전자
1	466125	5792929	Plants with modified flowers	형질전환 작물
2	466123	5723763	Plants with modified flowers	형질전환 작물
3	485793	6316699	Plants with modified stamen cells	형질전환 작물
4	27580	6372967	Plants with modified stamen cells	형질전환 작물
5	485788	6320097	Plants with modified stamen cells	형질전환 작물
6	485511	6344598	Plants with modified stamen cells	형질전환 작물
7	465609	5866784	Recombinant plant expressing non-competitively binding insecticidal crystal proteins	형질전환 작물
8	463240	5908970	Recombinant plant expressing non-competitively binding Bt insecticidal crystal proteins	형질전환 작물
9	465526	5723762	Transgenic plants expressing a prokaryotic ammonium dependent asparagine synthetase	형질전환 작물
10	360176	5545819	Transgenic plants expressing a prokaryotic ammonium dependent asparagine synthetase	형질전환 작물
11	361467	5633441	Plants with genetic female sterility	형질전환 작물
1	10612	4975374	Expression of wild type and mutant glutamine synthetase in foreign hosts	형질전환 기술
2	556434	5098838	Expression of wild type and mutant glutamine	형질전환

			synthetase in foreign hosts	기술
1	485516	6627799	Plants with modified stamen cells	형질 전환체
1	464295	5502271	Maize resistant to aryloxyphenoxyalkanecarboxylic acid herbicides	저항성 작물
2	463241	5646024	Genetically engineered plant cells and plants exhibiting resistance to glutamine synthetase inhibitors, DNA fragments and recombinants for use in the production of said cells and plants	저항성 작물
3	395649	5689041	Plants modified with barstar for fertility restoration	저항성 작물
4	700116	5145777	Plant cells resistant to herbicidal glutamine synthetase inhibitors	저항성 세포
1	715751	5391725	Organ-specific plant promoter sequences	Promoter
1	938370	6683027	Herbicidal mixtures	혼합제
2	719429	6534444	Herbicidal mixtures having a synergistic effect	혼합제
1	485360	5908810	Method of improving the growth of crop plants which are resistant to glutamine synthetase inhibitors	재배기술
2	583076	5739082	Method of improving the yield of herbicide-resistant crop plants	재배기술
1	413618	5948612	Biological screens for detection of herbicides	검색기술
유럽				
1	8910418	333033	Glutamine synthesis gene and glutamine synthetase	유전자
1	9812313	919119	Aryloxy-phenoxy-alkane carboxylic acid herbicide resistant maize	저항성 작물
2	9031249	430511	Soybean plants resistant to glutamine synthetase inhibitors	저항성 작물
3	8740054	242246	Plant cells resistant to glutamine synthetase inhibitors, made by genetic engineering	저항성 세포
4	8740014	242236	Plant cells resistant to glutamine synthetase inhibitors, made by genetic engineering	저항성 세포
5	8710285	239801	Plant cells resistant to herbicidal glutamine synthetase inhibitors	저항성 세포
6	8790194	258410	Plant cells resistant to herbicidal glutamine synthase inhibitors	저항성 세포
7	8590514	200746	Plant cells resistant to herbicidal glutamine synthetase inhibitors	저항성 세포
1	9190205	511979	Transgenic plants expressing a prokaryotic ammonium dependent asparagine synthetase	형질 전환체
2	128293.8	1090999	Plant with modified flowers	형질 전환체
1	8790224	259481	Expression of wild type and mutant glutamine synthetase in foreign hosts.	형질전환 기술
2	8710393	240792	Expression of wild type and mutant glutamine synthetase in foreign hosts	형진전환 기술
1	9410049	608722	Biological screens for detection of herbicides	검색기술
1	9492484	714237	Method of increasing the yield of	재배기술

			herbicide-resistant crop plants	
일본				
1	19880071 552	1989024 3990	Gene capable of coding glutamine synthetase	유전자
2	19890122 625	1990030 3491	Gene coding precursor of chlorophyll-localized glutamine synthetase	유전자
3	19890154 157	1990018 2190	Gene coding glutamine synthesizing enzyme	유전자
4	19890052 798	1990024 2684	Gene and enzyme for synthesizing glutamine	유전자
1	19840102 389	1985024 8190	Preparation of phophinothericin	합성기술
1	19940023 612	1994025 3829	Biological screening for detecting herbicide	검색기술

Table 6-6. Patents analysis HPPD inhibiting herbicides

App. No	Reg. No	Contents		
미국				
1	969032	606911 5	Method of controlling weeds in transgenic crops	방제기술
2	945515	626854 9	DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and production of plants containing a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and which are tolerant to certain herbicides	유전자
3	252292	624596 8	Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicides	유전자
4	567615	676804 4	Chimeric hydroxyl-phenyl pyruvate dioxygenase, DNA sequence and method for obtaining plants containing such a gene, with herbicide tolerance	유전자
1	484562	628116 8	Herbicidal compositions and method of safening herbicides using benzothiazole derivatives	약해 경감제
1	369875	584386 9	Inhibitors of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and an assay for identification of inhibitors	탐색기술
2	462621	578651 3	Inhibitors of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and an assay for identification of inhibitors	탐색기술
3	16600	655571 4	Inhibitors of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and an assay for identification of inhibitors	탐색기술
1	37531	675037 8	Maize H3C4 promoter combined with the first intron of rice actin, chimeric gene comprising it and transformed plant	Promoter
유럽				

1	98954545	1029060	Chimeric hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase, DNA sequence and method for obtaining plants containing such a gene, with herbicide tolerance.	유전자
2	98954531	1029059	Mutated hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase, DNA sequence and method for obtaining herbicide-tolerant plants containing such gene	유전자
3	9692088	828837	DNA sequence of a gene of hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase and production of plants containing a gene of hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase and which are tolerant to certain herbicides	유전자
4	9793287	937154	Chimera gene with several herbicide resistant genes, plant cell and plant resistant to several herbicides.	유전자
5	9794056	938546	HPPD gene and inhibitors	유전자
6	962580.7	1315801	Hydroxyphenyl pyruvate fused with a signal peptide, DNA sequence and use for obtaining plants containing herbicide-tolerant plants.	유전자
1	300301.9	1021953	Herbicidal compositions and method of safening herbicides using benzothiazole derivatives	약해 경감제
1	9410263	614970	Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase inhibitors and assay for the identification of the enzyme	탐색기술
1	98401657	968649	Adjuvants for novel dry herbicide formulations	제제기술

Table 6-7. Patents analysis PDS inhibiting herbicides

App. No	Reg. No	Contents		
미국				
1	359302	6303848	Method for conferring herbicide, pest, or disease resistance in plant hosts	저항성
일본				
1	20010127652	20020355040	Method for detecting enzyme modulator in biosynthetic pathway of carotenoid.	탐색기술
2	19930163926	19940343473	Production of plant resistant to bleaching herbicide	저항성 작물

Table 6-8. Patents analysis PPO inhibiting herbicides

App. No	Reg. No	Contents		
미국				
1	730525	6808904	Herbicide-tolerant protox genes produced by DNA shuffling	유전자

2	102420	608415 5	Herbicide-tolerant protoporphyrinogen oxidase (protox) genes	유전자
3	50603	602301 2	DNA molecules encoding plant protoporphyrinogen oxidase	유전자
4	808931	593960 2	DNA molecules encoding plant protoporphyrinogen oxidase and inhibitor-resistant mutants thereof	유전자
1	770738	675957 9	Inbred maize line NP2171	저항성 작물
2	248453	606399 1	Soybean cultivar S80-J2	저항성 작물
3	251920	626234 7	Soybean cultivar M001483	저항성 작물
4	234274	607211 0	Inbred maize line NP2029	저항성 작물
5	251308	620443 8	Inbred maize line <<NP2141>>	저항성 작물
6	317334	618800 3	Inbred sweet corn line	저항성 작물
7	364849	616630 4	Inbred maize line NP2208	저항성 작물
8	465068	631670 1	Inbred maize line NP2138	저항성 작물
9	55746	670695 5	Inbred maize line NP2276	저항성 작물
10	240405	616923 3	Inbred maize line NP2031	저항성 작물
11	240167	618444 4	Inbred maize line NP2115	저항성 작물
12	249125	604050 1	Soybean cultivar B630518RR	저항성 작물
13	250211	603752 8	Soybean cultivar C910928	저항성 작물
14	250233	604050 2	Soybean cultivar C405323	저항성 작물
15	249037	606678 4	Soybean cultivar J335752	저항성 작물
16	249214	608415 8	Soybean cultivar M003360	저항성 작물
17	598755	635093 7	Soybean cultivar M713612	저항성 작물
18	575631	636240 2	Soybean cultivar S38-T8	저항성 작물
19	604588	635315 7	Soybean cultivar LRR969242	저항성 작물
20	603491	635093 8	Soybean cultivar M714376	저항성 작물
21	598756	634665 9	Soybean cultivar S24-K4	저항성 작물

22	251922	629743 0	Soybean cultivar J540909	저항성 작물
23	262399	614056 3	Inbred maize line NP2151	저항성 작물
24	318102	603430 6	Inbred sweet corn line R398D	저항성 작물
25	470609	635315 9	Inbred maize line NP2213	저항성 작물
26	318103	599039 5	Inbred sweet corn line W1498A	저항성 작물
27	241585	665710 9	Inbred maize line NP2015	저항성 작물
28	874805	666091 3	Soybean cultivar S32-M2	저항성 작물
29	874639	666445 0	Soybean cultivar J604217	저항성 작물
30	874640	667398 9	Soybean cultivar M800188	저항성 작물
31	873519	667052 9	Soybean cultivar SJ743473	저항성 작물
32	874800	666444 8	Soybean cultivar S10-T1	저항성 작물
33	605159	642644 9	Soybean cultivar M001219	저항성 작물
34	191998	630712 9	Herbicide tolerant plants, plant tissue or plant cells having altered protoporphyrinogen oxidase activity	저항성 작물
35	707589	672390 1	Inbred maize line NP2052	저항성 작물
36	15683	628830 6	Methods of selecting plants, plant tissue or plant cells resistant to a protoporphyrinogen oxidase inhibitor	저항성 작물 선별기술
1	196268	628283 7	Methods of controlling the growth of undesired vegetation with herbicide tolerant plants or plant seeds having altered protoporphyrinogen oxidase activity	방제기술
2	497698	630845 8	Herbicide-tolerant plants and methods of controlling the growth of undesired vegetation	저항성 작물 방제기술
3	371770	672368 1	Herbicidal compositions for tolerant or resistant cereal crops	방제기술
4	762673	667727 6	Herbicides for tolerant or resistant oil seed rape cultures	방제기술
5	336602	559976 8	Stabilization of non-aqueous suspensions	제제기술
6	75351	671343 3	Coformulation of an oil-soluble herbicide and a water-soluble herbicide	제제기술
1	729233	645546 9	Herbicidal composition	혼합제

2	304808	670334 9	Enhanced herbicide composition	혼합제
3	23100	676215 1	Methods of and compositions for plant defoliation	혼합제
4	814305	529850 2	Method and composition for photodynamic treatment and detection of tumors	혼합제
5	170467	540780 8	Method and composition for photodynamic treatment and detection of tumors	혼합제
1	808323	601810 5	Promoters from plant protoporphyrinogen oxidase genes	Promoter
1	71296	617724 5	Manipulation of protoporphyrinogen oxidase enzyme activity in eukaryotic organisms	효소생산 증대
2	472028	576737 3	Manipulation of protoporphyrinogen oxidase enzyme activity in eukaryotic organisms	효소생산 증대
유럽				
1	98941799	102052 5	Novel protoporphyrinogen oxidase tolerant to light-requiring herbicides	유전자
2	940419.5	120061 1	Herbicide-tolerant protoporphyrinogen oxidase	유전자
3	9790798	883682	DNA molecules encoding plant protoporphyrinogen oxidase and inhibitor-resistant mutants thereof.	유전자
1	2793460	145963 0	Mixed fine grains containing glyphosate	제제기술
2	2792064	145962 9	Fine grains for controlling weeds stable to climate changes	제제기술
1	9090135	447491	Use of certain herbicides in cancer treatment and production of protoporphyrin IX	암치료 기술
1	9591872	769059	Manipulation of protoporphyrinogen oxidase enzyme activity in eukaryotic organisms.	효소생산 증대
1	96944520	100770 3	Methods of conferring PPO-inhibiting herbicide resistance to plants by gene manipulation	저항성 작물 개발기술
1	9790884	885305	Promoters from plant protoporphyrinogen oxidase genes	Promoter
1	2722807	143077 6	Herbicide composition	혼합제
일본				
1	19960113 295	199702 75986	Transgenic plant resistant to herbicide	저항성 작물
2	248453	606399 1	New protoporphyrinogen oxidase	유전자

제 7 장 참고문헌

1. Abell, L.M., J.V. Schloss, and A.R. Rendina, 1993. Target-site directed herbicide design. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser., 16-37.
2. Abell, L.M. 1996. Biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design. Weed Sci., 44:734-742.
3. Bartley, G.E., P.A. Scolnik, and P. Beyer. 1999. Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturases, phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-*cis* pathway to yield pro-lycopene. Eur. J. Biochem., 259:396-403.
4. Bourque, J.E. 1995. Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Science* 105: 125-149
5. Broach J.R. and J. Thorner, 1976, High-throughput screening for drug discovery. Nature, 384(6604): 14-16.
6. Chory, J., J.R. Ecker, S. Briggs, M. Caboche, G.M. Coruzzi, D. Cook, J. Dangl, S. Grant, M.L. Guerinot, S. Henikoff, R. Martienssen, K. Okada, N.V. Raikhel, C.R. Somerville, and D. Weige. 2000. National Science Foundation-Sponsored Workshop Report: "The 2010 Project" Functional Genomics and the Virtual Plant. A Blueprint for Understanding How Plants Are Built and How to Improve Them. *Plant Physiology*, 123:423-425.
7. Coulter, C.V., J.A. Gerrard, J.AE Kraunsoe, and A.J. Pratt. 1999. *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase and dihydrodipicolinate reductase: kinetic and inhibition studies of two putative herbicide targets. Pestic. Sci., 55:887-895.
8. Cromartie, T.H., K.J. Fisher, J.N. Grossman. 1999. The discovery of a novel site of action for herbicidal bisphosphonates. Pestic. Biochem. & Physiol., 63(2): 114-126.
9. D'Aoust, M.A., S. Yelle,, and B. Nguyen-Quoc. 1999. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* 11: 2407-2418.
10. Ficarelli, A., F. Tassi, and F.M. Restivo. 1999. Isolation characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in *Nicotina plumbaginifolia*.

- Plant Cell Physiol. 40(3):339-342.
11. Grossmann, J. and H. Schiffer. 1999. Protoporphyrinogenoxidase-inhibiting activity of the new, wheat-selective isoindoldione herbicide, cinidon-ethyl. Pestic. Sci., 55:687-695.
 12. Hess, F.D., R.J. Anderson and J.D. Reagan. 2001. High throughput synthesis and screening: the partner of genomics for discovery of new chemicals for agriculture. Weed Sci. 49:249-256.
 13. Höfgen, R., K.B. Axelsen, C.G. Kannangara, I. Schuttke, H.D. Pohlentz, L. Willmitzer, B. Grimm, and D. von Wettstein. 1994. A visible marker for antisense mRNA expression in plants: Inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1-semialdehyde aminotransferase antisense gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:1726-1730.
 14. Höfgen, R., B. Laber, I. Schuttke, A. Klonus, W. Streber, and H. Pohlentz. 1995. Repression of acetolactate synthase activity through antisense inhibition. Plant Physiol. 107:469-477.
 15. Höfgen, R. 1998. Antisense gene expression as a tool for evaluating molecular herbicide targets. Extended summaries-8th International Congress of Pesticide Chemistry, 175-177.
 16. I.T. Hwang, K.H. Lee, S.H. Park, K.S. Hong, S.S. Han, and K.Y. Cho. 2001. Resistance to Acetolactate Synthase Inhibition in a Biotype of *Monochoria vaginalis* Discovered in Korea. Pesticide Biochemistry and Physiology, 71, 69-76.
 17. I.T. Hwang, Y.K. Ko, T.J. Kim, D-W. Kim, K.Y. Cho, 2000. Structure-Activity Relationships of Acetolactate Synthase Inhibition among New Benzene sulfuonylureas in Rice(*Oryza sativa*) and Barnyardgrass(*Echinochloa crus-galli* var. *oryzicola*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 68, 166-172.
 18. Jingrui Wu, In Taek Hwang, and Kriton K. Hatzios. 1999. Effects of Chloroacetanilide Herbicides on Membrane Fatty Acid Desaturation and Lipid Composition in Rice, Maize and Sorghum. Pesticide Biochemistry and Physiology, 65, 73-81.
 19. Kishore, G.M. and D.M. Shah. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as

- herbicides. *Ann. Rev. Biochem.*, 57:627-663.
20. Kleier, D.A. and F.C. Hsu. 1996. Phloem mobility of xenobiotics. VII. The design of phloem systemic pesticides. *Weed Sci.*, 44:749-756.
 21. Pillmoor, J.B., S.D. Lindell, G.G. Briggs, and J. Wright. 1995. The influences of molecular mechanism of action in herbicide design. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 292-303.
 22. Rendina, A.R. and L.M. Abell, 1994. Biochemical Approaches to Herbicide Discovery, enzyme target selection and inhibitor design. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 407-424.
 23. Saari, L.L. 1999. A prognosis for discovering new herbicide sites of action. In "Pesticide Chemistry and Bioscience: The Food-Environment Challenge" Ed. by G.T. Brooks and T.R. Robers Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 207-220.
 24. Schloss, J.V. and A. Aulabaugh, 1990. Acetolactate synthase and ketol-acid reductoisomerase: Targets for Herbicides Obtained by Screening and *de novo* Design. *Z. Naturforsch.*, 45c, 544-551.
 25. Tang, G-Q. and A. Sturm. 1999. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Molecular Biology* 41: 465-479.
 26. The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(14): 796-815.
 27. Zimdahl, R.L. 1993. *Fundamentals of weed science*. Academic Press, Inc. San Diego, 450p.
 28. 畑中 利彦, 2000, ハイスル-PUTT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.
 29. 松中 昭一, 2000, 農薬のおはなし, 日本規格協会 pp. 16-18, 東京.
 30. 고영관, 장해성, 류재욱, 우재춘, 구동완, 황인택, 김대황. 2001. β -hydroxyalkyl subgroup을 갖는 새로운 벤젠술포닐우레아 유도체: 합성과 생리활성. *농약과학회지*, 5(3), 58-62.
 31. 박상희, 황인택, 이관휘, 최정섭, 변종영, 조광연. 2001. Acetolactate synthase에

- 대한 고효율 활성 측정방법 및 신규 저해제 탐색. 농약과학회지, 5(3), 41-46.
32. 정봉진, 김대황, 조광연. 2001. 신규제초제 개발현황. 한국잡초학회지, 21(2):1167-180.
 33. 황인택, 김진석, 조광연, 요네야마 코이치, 요시다 시게오. 1993b. 신규 합성화합물들이 cyanobacteria의 광합성 전자전달계에 미치는 영향. 한국잡초학회지, 13(2):89-95.
 34. 황인택, 최정섭, 박상희, 이관희, 이병희, 홍경식, 조광연. 2001a. 식물특정효소 저해제의 생물활성 조사에 의한 신규제초제 작용점 탐색. 농약과학회지, 5(1):36-45.
 35. 황인택, 문영희, 한성수, 전재철. 2001b. 제초제와 환경. 한국잡초학회지, 21(2):146-166.
 36. 황인택, 이동희. 2001. 신규 제초제 개발을 위한 유용기능성 유전자발굴 및 기능조절물질 탐색. 정밀화학, 61, 45-52.
 37. 황인택, 이동희, 최정섭, 김태준, 김범태, 박유신, 조광연. 2001. 식물치사관련 유전자를 이용하는 신규 제초제 작용점 탐색 및 조절물질 개발동향. 농약과학회지, 5(3), 1-11.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.