

# 전기뱀장어 및 집파리 AChE를 이용한 살충제의 *In Vitro* AChE 저해 시험

## *In Vitro* AChE Inhibition Tests of Insecticides Using Electric eel and Housefly AChE

李時赫<sup>1</sup> · 李俊浩<sup>2</sup> · 趙匡衍<sup>1</sup>

Si Hyeock Lee<sup>1</sup>, Joon Ho Lee<sup>2</sup>, and Kwang Yun Cho<sup>1</sup>

**ABSTRACT** Experiments were conducted to establish an *in vitro* AChE inhibition test system to evaluate the potency of AChE inhibition of new chemical compounds. For a fixed time inhibition test, optimal inhibition (incubation) time to evaluate their AChE inhibition potency was 10 min. for AChE inhibitors such as DFP, DDVP, and paraoxon. The concentration of new chemical compounds with an ester group for evaluation of their inhibition potency was 10  $\mu$ M under 10 min. preincubation conditions. However, the stepwise inhibition test with higher concentrations seemed to be needed for other chemical compounds. For a progressive inhibition test to calculate inhibition constants such as  $K_d$ ,  $k_3$  and  $k_i$ , extremely low  $k_d(1.3 \times 10^{-8} \sim 5.6 \times 10^{-7})$  and  $k_3(0.21 \sim 0.27 \text{ min}^{-1})$  were observed under lagged preincubation time (0.8–13.3 min) and low inhibitor concentrations ( $1 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-6}$ M). However, this method seemed to be useful for comparison of AChE inhibition potency among inhibitors. Differences in inhibition potency among DFP, paraoxon, and KH501 were due to the differences in  $K_d$ , in other words, differences in affinities between inhibitors and AChEs. Therefore, AntiChE screening should consist of two steps. The first step is to evaluate the potency of AChE inhibition based on  $I_{50}$  value obtained from fixed time inhibition tests. The second step is to study inhibition patterns and characteristics of chemical compounds selected in the first step.

**KEY WORDS** *In vitro*, AChE inhibition test, electric eel, housefly

**초 록** 신규화합물의 *in vitro* AChE 저해력을 평가하기 위한 저해시험법의 확립을 목적으로 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.  $I_{50}$  산출이 가능한 고정시간 저해시험(fixed time inhibition test)의 경우, DFP, DDVP 및 paraoxon과 같은 대표적 AChE 저해제의 저해력 평가에 적당한 저해시간은 10분 정도로 조사되었으며, 10분간의 저해조건하에서 ester group을 보유한 신규화합물의 저해여부 및 정도의 평가에 효과적인 시험농도는 10 $\mu$ M 수준으로 관정되었으나 다른 화합물의 경우에는 보다 높은 농도로부터의 단계적 저해시험이 필요한 것으로 보였다.  $K_d$ ,  $k_3$  및  $k_i$ 와 같은 저해상수의 산출을 위한 경시적 저해시험(progressive inhibition test)에 있어서, 본 실험의 장시간 저해(0.8~13.3분)와 낮은 저해제농도( $1 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-6}$  M)의 조건하에서는 극히 낮은  $K_d(1.3 \times 10^{-8} \sim 5.6 \times 10^{-7}$ M) 및  $K_3(0.21 \sim 0.27 \text{ min}^{-1})$ 가 관찰되었으나 저해제간의 저해독성 조사에는 충분한 타당성을 가지는 것으로 조사되었다. 또한 DFP, paraoxon 및 신규화합물인 KH501간의 현격한 저해력 차이는  $K_d$ 의 차이 즉, 저해제와 AChE간의 친화력 차이에 기인된 것으로 판명되었다. 따라서 AntiChE 스크리닝에 있어서 1차단계에서는 고정시간 저해법을 통하여 산출된  $I_{50}$ 를 바탕으로 하여 저해력 유무 및 정도

1 韓國化學研究所 農藥活性研究室(Korea Research Institute of Chemical Technology, Pesticide Lab.)

2 서울대학교 農生物學科(Dept. of Agricultural Biology, Seoul Natl. University)

를 파악하고, 1차단계에서 고도의 AChE 저해력이 인정된 신규 화합물을 대상으로 2차단계인 경시적 저해법을 이용하여 저해양상 및 특성을 조사하는 것이 합리적인 체계일 것으로 생각되어진다.

### 검 색 어 *In vitro*, AChE 저해시험, 전기뱀장어, 집파리

오늘날 해충방제에 사용되는 살충제의 50~60%를 점유하고 있는 살충제가 바로 유기인계와 카바메이트계로서 이들은 곤충중추신경내의 신경전달 물질인 acetylcholine(ACh)을 가수분해하는 acetylcholinesterase(AChE)의 저해제로 알려져 있다(Hutson & Roberts 1985). 이들 anticholinesterase(AntiChE)는 역시 신경저해제 살충제인 pyrethroids(Ware 1983, Hutson & Roberts 1985)와 함께 그 탁월한 속효적 살충력으로 말미암아 앞으로 상당히 오랫동안 세계 살충제 시장을 지배할 것으로 보인다.

따라서 신규살충제 개발에 있어서 AChE와 화합물간의 상호반응에 관한 연구를 토대로 생합리적 구조변환 및 분자설계를 통해 신규 AntiChE를 창출해 내는 것도 종래의 살충기작과는 상이한 작용기구를 가지는 새로운 lead 화합물의 탐색 못지않게 중요한 의미를 가질 것이다.

이를 위해서는 일차적으로 곤충기원의 AChE에 대한 신규화합물의 저해정도 및 저해 특성조사가 용이하게 이루어질 수 있는 효과적인 *in vitro* 저해시험법의 확립이 전제되어야 하는데, 이들 *in vitro* 검정법은 *in vivo* 검정법에 비해 작용점에 미치는 분자구조의 영향을 보다 명확하게 파악할 수 있을 뿐만 아니라 시간과 인력을 대폭 절감할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 작용점저해와 살충력간의 총체적 관계규명을 위해서는 화합물과 곤충개체간의 독리동태학적 연구(toxicodynamics)도 후속적으로 추진되어야 할 것이다.

본 실험에서는 일단 *in vitro* AntiChE 스크리닝체계확립의 기초적 단계로서 전기뱀장어 및 집파리 AChE와 몇가지 유기인계 저해제를 대상으로 한 고정시간저해시험(fixed time inhibi-

tion test) 및 경시적저해시험(progressive inhibition test)의 방법 확립을 주 목적으로 하였다.

### 재료 및 방법

#### 효소원(AChE source)

전기뱀장어 AChE(EC 3117)는 Sigma제품(5000U)을 사용하였으며 집파리 AChE의 경우에는 *이 등(1990)*의 방법에 따라 WHO표준계통 집파리(*Musca domestica* L.) 성충의 두부를 마쇄하여 700 g로 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 하였다.

#### 시 약

Acetylthiocholine chloride (ATCh), 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 및 sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )는 Sigma 제품을, triton X-100은 Yakuri Chemical 제품을, 그리고 acetone은 Aldrich, HPLC급을 사용하였으며 buffer 및 모든 수용액의 조제에는 이온교환수(전도도  $0.1\mu\text{S}$ )를 사용하였다.

#### 저해제

Diisopropylfluorophosphate(DFP), tetraethylpyrophosphate(TEPP, 90%) 및 paraoxon(95%)은 Sigma사로부터, Parathion(98.2%)은 Altec chemical사로부터 구입 사용하였다. DDVP(95%), diazinon(95.6%) 및 acephate(95%)는 각각 동방농약, 서울농약 및 영일화학으로부터 제공받은 원제를 사용하였으며 신규화합물인 9007(>95%)(한국화학연구소 1990) 및 KH501: O,O-diethyl-O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) phosphate(>95%), KH502: O,O-di-

ethyl - O - (1 - phenyl - 3 - trifluoromethyl - 5 - pyrazoyl) thiophosphate(>95%), KH259 : O,O - diethyl - O - (1 - methyl - 4 - chloro - 5 - trifluoromethyl-3-pyrazoyl) thiophosphate(>95%), KH263 : O,O - diethyl - O - (1 - methyl - 3 - trifluoromethyl-5-pyrazoyl) thiophosphate(>95%) 등 (한국화학연구소 1988)은 한국화학연구소에서 합성된 것들이다.

### 저해제 수용액 조제

모든 저해제는 acetone에 용해시켜 10 nM의 고정용액(stock solution)을 조제한 후 pH 7.5, 0.1M sodium phosphate buffer에 소정농도로 희석시켜 사용하였다. 그러나 고농도조건에서 용이하게 수용화되지 않는 저해제의 경우에는 triton X-100 buffer 수용액(50 ppm)에 희석하여 유평화시킨 후 시험에 사용하였는데, 이때 시험용액의 acetone 4% 및 triton X-100에 의한 AChE 저해효과는 전무한 것으로 관찰되었다.

### AChE 잔여활성 측정

소정농도의 저해제 수용액과 AChE 현탁액을 혼합하여 일정시간 동안 30°C에서 배양(incubation)한 후 AChE-저해제 혼합액 0.5 ml를 cuvette(path length 1 cm)내의 기질수용액(전기뱀장어 AChE의 경우, ATCh 2.5 mM, DTNB 1.0 mM; 집파리 AChE의 경우, ATCh 0.5 mM, DTNB 0.33 mM; pH 7.5, 0.1 M sodiumphosphate buffer) 3.0 ml에 신속하게 첨가, 혼합한 다음 Ellman 등(1961)의 방법에 따라 spectrophotometer (Beckman DU-65, Kinetics Soft Pack Module 및 Water circulator 장착)를 이용하여 30°C 조건에서 412 nm에서의 흡광도 증가를 13초 간격으로 1.2~3분동안 측정하여 흡광도 증가율을 AChE 반응속도로 하였다. 잔여활성(remaining activity)은 무처리 AChE 반응속도에 대한 저해 AChE 반응속도의 백분율(%)로 하였다.

### 고정시간 저해시험(Fixed time inhibition test)

AChE에 대한 저해제의 저해력을 나타내는 하나의 개념으로서 효소반저해농도( $I_{50}$  또는  $pl_{50}$ )를 들 수 있는데, 이는 저해제의 각 농도에 대한 저해정도를 바탕으로 probit 분석을 통해 산출되며, 저해제의 저해특성조사에는 부적합하지만 저해력을 용이하게 파악할 수 있는 장점이 있다.

d-Tubocurarine과 같은 가역적저해제의 경우에는 효소, 저해제 및 기질을 어떠한 순서로 혼합, 반응시켜 저해율을 조사해도 무방하나 유기인제와 같은 비가역적저해제에 있어서는 AChE를 소정농도의 저해제와 일정시간 동안 반응(incubation)시킨 후 포화량의 기질을 첨가하여 잔여활성을 측정하는 다음 이로부터 저해율을 계산하게 된다(Aldridge & Reiner 1972). 이와 같이 AChE를 저해제로 일정시간 저해시킨 후 잔여활성을 측정하는 방법을 고정시간저해법이라 하는데, 이때 저해량을 결정하는 주요인인 저해제 농도와 저해시간(incubation time)간에는 일정수준의 저해량에 대해 반비례 관계가 성립한다.

그런데 일반적으로 유기합성화합물은 수용성이 낮기 때문에 완전 용해된 저해제 시험용액을 조제하기 위해서는 적정수준 이하로 농도를 저하시켜야 한다. 그러므로 저해제의 시험농도를  $10^{-4}$ ~ $10^{-10}$ M(분자량이 300 이라면 30 ppm~0.03 ppb) 수준으로 설정한다면 이와 같은 농도 조건하에서 시험화합물의 저해력이 충분히 발현될 수 있는 적정 저해시간의 결정이 중요한 실험적 요인으로 남게 된다. 따라서 고정시간 저해 시험시의 최적 저해시간을 결정하기 위해 전기뱀장어 AChE와 4종의 살충제(TEPP, DDVP, Acephate, Diazinon) 및 1종의 신규화합물(9007)을 소정 시간별로 반응시킨 후 기질수용액과 혼합하여 잔여활성을 측정하였다.

### 경시적저해시험(Progressive inhibition test)

AChE 저해제의 저해력을 나타내는 또 하나의 개념으로서 저해제 농도별 저해속도에 바탕

을 둔 저해상수인  $k_i$ (bimolecular rate constant)를 들 수 있는데, 이는 경시적저해시험을 통해 산출된다.

유기인계저해제와 AChE간의 반응은 scheme 1에 나타낸 바와 같은데, AChE 저해정도는 두 가지의 독립적인 요인, 즉 효소-저해제복합체 (EH·PX)가 EP로 전환되어지는 속도와 EH·PX의 형성 및 분해정도에 의해 결정된다 (Aldridge & Reiner 1972).

반응이  $k_i$ 에 의해 지배될 경우 저해력은 주로 phosphorylation의 정도에 의해 결정되나 (Aldridge 1950), AChE의 phosphorylation 과정 이전에 상당량의 가역적 효소-저해제복합체의 형성이 선행된다면 저해제의 AChE에 대한 친화성 역시 중요한 저해요인이 되는데 이 경우에 저해력은 dissociation constant,  $K_d(= [k_2 + k_3]/k_1 \approx k_2/k_1)$ , 및 phosphorylation constant,  $k_3$ 에 의해 결정된다(Main 1964).

ChE와 저해제간의 전반적인 효소동태(enzyme kinetics)는 Aldridge & Reiner(1972)에 의해 상세히 기술된 바 있으므로 각 수식의 세부적인 도출과정은 생략하고 각각의 저해상수 산출을 위한 기본적 내용만을 설명하기로 한다.

Scheme 1로부터 EH의 phosphorylation 속도는 다음의 식으로 규정된다.

$$1_n(u/u_0) = -\frac{k_3[PX]}{[PX] + K_d} t \dots\dots\dots(1)$$

여기서  $u_0$ 는 저해되지 않은 AChE의 활성,  $u$ 는  $t$ 시간 동안 저해된 AChE의 활성,  $t$ 는 저해 시간(incubation time),  $[PX]$ 는 저해제의 농도이며  $K_d$ 는 dissociation constant이다.

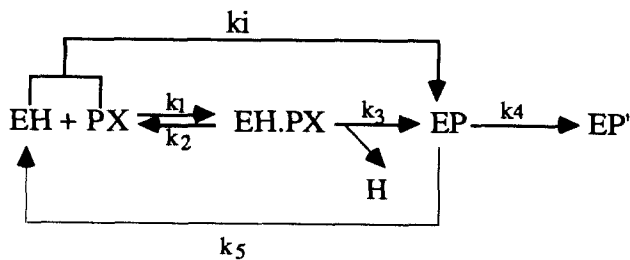
$$K_d = \frac{[EH][PX]}{[EH \cdot PX]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

(여기서  $k_3$ 는 무시할 정도의 적은 값을 가짐)  $\dots\dots\dots(2)$

$[PX]$ 는 실험과정중 거의 변동이 없다는 가정하에 상수화할 수 있으므로 시간  $t$ 에 대한  $1_n(u/u_0)$ 의 plot은  $-k_3[PX]/([PX] + K_d)$ 의 기울기를 갖는 직선식이 된다. 여기서 기울기를 저해의 1차반응속도 (first order rate constant,  $\rho$ )라 하는데 시간경과에 따른 저해율을 나타내며 다음과 같은 수리적 의미를 갖는다.

$$\rho = \frac{k_3}{1 + K_d/[PX]} \dots\dots\dots(3)$$

여기서  $[PX] < K_d$  조건하에서는  $[PX]$ 가 증가하면  $\rho$  역시 증가한,  $[PX] = K_d$  이면  $\rho = k_3/2$ 이며,  $[PX] \gg K_d$ 일 경우에는  $[PX]$ 가 무한하게 증가하여도  $\rho$ 는 거의 일정하며  $k_3$ 에 근접



**Scheme 1.** Elementary reactions in the interaction of AChE with organophosphate. EH, active enzyme ; PX, organophosphate ; EHPX, Michaelis enzyme-inhibitor complex ; EP, phosphorylated enzyme ; EP', aged enzyme ;  $k_1$ , etc., rate constants for the individual step.

하게 됨을 알 수 있다.

한편 방정식 (3)은 Lineweaver-Burk plot (1 /ρ : 1/[PX] plot, Wilkinson 1961)으로 전환될 수 있다. Lineweaver-Burk plot으로 나타내면,

$$\frac{1}{\rho} = \frac{1}{k_3} + \frac{k_3}{K_d} \cdot \frac{1}{[PX]} \dots\dots\dots(4)$$

여기서 실측값 1/ρ을 1/[PX]에 대해 산포시키면 k<sub>3</sub>, K<sub>d</sub>를 X, Y축의 절편을 통해 산출할 수 있다.

그런데, Michaelis complex, EH·PX,의 형성이 무시할 정도라면 방정식 (1)은 bimolecular rate constant, k<sub>i</sub>,를 도입한 다음의 식으로 단순화된다.

$$1_n(u/u_0) = -k_i[PX] t \dots\dots\dots(5)$$

[PX]는 실험중 일정하다는 가정하에 k<sub>i</sub>[PX]를 저해의 1차반응속도(ρ)라 할 수 있으며 실측값 ρ와 [PX]로부터 k<sub>i</sub>(=ρ/[PX])를 산출할 수 있다.

방정식 (1)과 (5)로부터,

$$\rho = \frac{k_3[PX]}{[PX] + K_d} = k_i[PX] \dots\dots\dots(6)$$

이므로 K<sub>d</sub>>>[PX]라는 가정만 성립되면 방정식 (6)은 다음과 같이 k<sub>3</sub>, K<sub>d</sub> 및 k<sub>i</sub>의 관계로 단순화 될 수 있다.

$$\frac{k_3}{K_d} = k_i \dots\dots\dots(7)$$

그런데, 경시적저해가 방정식 (5)에 의해 정 의될 경우 K<sub>d</sub> 및 k<sub>3</sub>의 도출은 불가능하며 방정식 (7)은 효소-저해제 복합체의 형성이 무시될 수 없을 경우 방정식 (1)에만 적용할 수 있다.

이상으로부터, [PX]와 t가 고정된 조건하에서 k<sub>i</sub>(=k<sub>3</sub>/K<sub>d</sub>)가 크면 클수록 (즉, k<sub>3</sub>는 클수록, K<sub>d</sub>는 작을수록) 저해력이 증가됨을 알 수 있다. 일반적으로 유기인제 살충제에 있어서는 k<sub>3</sub>가 저해력의 주 요인인 반면, 카바메이트제의 경우에는 K<sub>d</sub>가 보다 중요한 역할을 하는

것으로 알려져 있다.

경시적저해시험에 있어서는 AChE를 소정농도의 저해제와 반응시킨 후 각 저해시간(t)에 대해 잔여활성 [log(u/u<sub>0</sub>)]을 산포시킨 다음 각 직선식의 기울기 (1차 반응속도, 2.303ρ)를 구하여 방정식 (4), (6) 및 (7)에 따라 각각의 저해상수를 산출하게 된다.

그런데 유기인제에 의한 AChE 저해반응에 있어서 잔여활성-저해시간의 semilog plot은 세 가지의 전형적인 특징, 즉 (1) 경시저해선(progressive inhibition line)은 일직선이며, (2) 1차 반응속도상수 ρ는 저해제 농도와 직선적 비례 관계를 가지며, (3) 모든 직선은 t=0일때 Y축의 2.0(=100% 잔여활성) 지점을 지난다 (Aldridge & Reiner 1972).

(1)의 조건이 만족되지 않는 경우, 다시 말하여 경시적 저해선이 곡선인 때는 spontaneous reactivation이 진행되는 경우이고, (2)의 특성과 부합되지 않는 경우에는 전저해(preincubation)과정중 상당량의 AChE-저해제 복합체가 형성된 경우이다. 또한 저해선이 Y축의 2.0점을 지나지 않는다면 preincubation 과정중이나 기질첨가후에 Michaelis type이 아닌 여타의 AChE-저해제 복합체가 형성되었기 때문이다.

본 실험에서는 예비실험을 통해 10분간의 저해시 10~90%의 저해를 유발하는 농도구간을 결정한 후 다시 5구간 정도로 세분하여 본 실험에 임하였다. 실험에 사용된 spectrophotometer에는 Kinetics Soft Package<sup>®</sup>와 Auto-6-Sampler가 장착되어 있어서 6개의 cuvette을 동시에 삽입한 후 순차적으로 각 시료의 흡광도를 입력된 시간별로 측정할 수 있는데, 이때 동일한 시료에 대한 측정시간 간격이 최소 13초이므로 총 측정시간을 짧게하면 ΔA/min 산출시 오차가 커질 우려가 있었다. 따라서 최소 5개의 측정점을 포함할 수 있도록 총반응측정시간을 1.2분, 측정후 시료교체 및 기타조작에 필요한 시간을 1.3분으로 하여 도합 2.5분의 시간간격으로 0.8, 3.3, 5.8, 8.3, 10.8 및 13.3분

의 preincubation(전저해) 조건하에서 경시적 저해를 조사하였으며 모든 시험은 30°C 조건하에서 수행하였다.

저해제와 효소의 시간별 저해에는 aliquot method, 즉 각 농도의 2.8 ml 저해제 수용액과 0.7 ml AChE 현탁액을 동시에 혼합한 후 매 preincubation 시간마다 0.5 ml의 AChE-저해제 반응액(혼합액)을 꺼내어 잔여활성을 측정하는 방법을 사용하였다.

다음 단계로서, 1차반응속도( $\rho$ )는 잔여활성-저해시간을 plot에서 각 산포점을 직선회귀 분석을 하여 산출하였는데, 초기 저해시간의 저해선이 심하게 굴곡된 경우에는 preincubation 시간을 세분하여 (10, 20, 30, 40 및 50초) 재실험한 뒤  $\rho$ 를 계산하였고, 저해선이 완만한 굴곡을 보이는 경우에는 초기의 3~4점을 직선회귀분석을 하여 그 기울기를  $\rho$ 로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 고정시간 저해시험(Fixed time inhibition test)

고정시간 저해시험의 최적저해시간을 결정하기 위해 전기뱀장어 AChE와 4종의 살충제 및 1종의 신규화합물을 소정 시간별로 반응시킨후 기질수용액과 혼합하여 잔여활성으로부터 산출한 각 저해시간별  $I_{50}$  값을 표 1에 정리하였다. 대표적인 AChE 저해제인 TEPP와 DDVP는 공통적으로 반응시간 10분 이후부터는  $I_{50}$ 의 변동이 소폭적인 것으로 보아 대개 10분 이내에 저해가 완료됨을 알 수 있다. Phosphoramidothioate인 acephate는 반응시간 10분에서 TEPP와 DDVP에 비해 약 1/710 및 1/210의 저해력을 보임으로서 각 저해제의 구조에 따른 현격한 저해력의 차이를 나타내고 있다.

한편, thio type의 유기인제는 S와 P간의 근소한 전기음성도 차이(0.4)에 기인된 친전자 공격성(electrophilic attack)의 부족으로 말미암아 *in vitro*에서는 저해력이 거의 없으나 동물체내의 산화계 (mixed function oxidase

system)에 의해 desulfuration되어 oxon type으로 전환되면 강력한 저해력을 가지게 된다고 알려져 있다. 본 실험에서도 thiophosphate인 diazinon은 시험농도의 전구간 (0.1~5.7 mM)에서 전혀 저해력을 보이지 않는 일관된 결과를 얻었다.

뿐만 아니라 수중 곤충에 대해 고도의 살충력을 보유한 oxadiazole계의 시험화합물인 9007(한국화학연구소 1990)은 최고 시험농도인 2.0 mM에서도 AChE 저해가 전무한 것으로 미루어 AChE 저해와는 무관한 살충기구를 가진 것으로 보인다.

이상의 결과로부터 TEPP나 DDVP 수준의 AChE 저해력을 가진 화합물의 경우에는  $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$ M 정도의 농도에서 10분정도의 반응시간이며 전기뱀장어 AChE의 저해여부 및 저해 정도의 조사가 가능할 것으로 여겨진다. 또한 대다수의 dimethyl phosphate 및 carbamate의 경우 spontaneous reactivation의 반감기가 수분에서 수십분 정도임을 감안한다면 반응시간이 연장될수록 AChE가 재생되어진 상태에서 저해력이 평가되므로 진정한 저해력과는 큰 편차를 가지게 될 우려가 있다. 따라서 고정시간 저해법을 통해 시험화합물의 AChE 저해여부 및 저해력을 평가할 경우 저해시간(반응시간)을 10분 정도로 설정함이 타당한 것으로 생각된다.

전기뱀장어 AChE를 이용한 저해시험 결과를 바탕으로 수종의 저해제를 집파리 AChE와 10분간 반응시켜 산출해 낸  $I_{50}$ 값을 표 2에 나타내었다. Phosphate인 DDVP, paraoxon 및 DFP의  $I_{50}$ 는 9~260 mM 수준으로서 고도의 AChE 저해 활성을 보이는데, 역시 phosphate인 신규화합물 KH501은 이보다 2~52배 높은 저해력을 보이고 있다.

한편, 집파리 AChE에 대한 DDVP의 저해력 ( $I_{50(t=10min)}=8.7$  mM)은 전기뱀장어 AChE( $I_{50(t=10min)}=2.5$   $\mu$ M)에 대해서 보다 291배 정도 높게 나타남으로써 AChE 기원에 따른 현저한 저해력 차이를 보이고 있다. 따라서 시험살충제의

AChE 저해력을 평가함에 있어서 여타기원의 AChE보다는 곤충기원의 AChE를 대상으로 조사하는 것이 타당한 이유가 이점에 있다 하겠다.

Thio type과 oxon type 저해제간의 저해력 차이는 parathion과 paraoxon 및 KH502와 KH501간의 관계에서 보듯이 thio type의 저해력은 각각의 oxon type에 비해 1/14,700 및 1/22,800 수준으로서 미약하게 나타나고 있다. Thiophosphate인 parathion, KH263 및 KH502

등이 보이는 미약한 활성 ( $I_{50}=1.1\sim6.1$  mM)은 각 화합물(>95%)내에 불순물로 미량 함유된 oxon 유사체의 활성으로부터 유래된 것일 수도 있고 thio type 그 자체의 고유활성에 기인된 것일 수도 있으나 본 실험의 자료만으로는 그 판별이 불가능하다.

그러나 같은 thiophosphate인 KH259(>95%)의 경우에 있어서는 특이하게 DFP와 유사한 수준의 높은 저해력을 보이는데, 5% 이내

**Table 1. Change of  $I_{50}$  values of five insecticides against electric eel AChE with the progression of inhibition(Incubation) time in 0.1M sodium phosphate buffer at pH 7.5, 25°C**

Chemical	Incubation time(min)	$I_{50}(\mu\text{M})$									
		0.5	3.0	5.5	8.0	10.5	13	15	30	50	70
TEPP		379.5	3.24	1.45	1.03	0.76	0.67	0.56	0.42	0.30	0.29
DDVP		35.4	4.69	3.38	3.00	2.54	2.35	2.30	1.55	2.08	1.63
Acephate		-	-	-	-	540	-	270	118	118	-
Diazinon		.....No activity shown below 5.7 mM.....									
9007(candidate comp.)		.....No activity shown below 2 mM.....									

의 oxon 유사체에 의한 활성으로 보기에 는 그 저해정도가 너무 높기 때문에 thio type 자체의 고유활성을 가정해 볼 수 있으나 확실한 규명을 위해서는 합성된 oxon 유사체 고유의 저해활성을 평가 비교함과 아울러 구조의 특이성에 기인된 P=S의 반응성에 대한 조사가 수반되어야 할 것이다.

이상의 실험결과로부터 신규시험화합물의 AChE 저해력을 이용한 고정시간저해법을 통하여 조사하고자 할 때, 시험화합물이 phosphate, carbamate 및 sulphate 등의 ester group을 보유하고 있을 경우에는 DFP, DDVP 및 paraoxon 등과 같은 강력한 AChE 저해제의 시험농도에 비해 40~1100배 높은 농도인 10  $\mu\text{M}$ 을 1차 시험농도로 하여 10분간 저해시킨 후  $I_{50}$ 를 산출한다면 저해력의 유무 및 저해정도 조사에 적합한 것임을 알 수 있다.

그러나 thiophosphate인 경우에는 그것의 oxon 유사체에 대해 시험하는 것이 *in vitro* 저해력 파악에 보다 타당하며 ester group을 보

유치 않는 다른 구조의 시험화합물에 대해서는 보다 높은 농도로부터의 단계적 저해시험을 통한 lead 화합물의 탐색이 요망된다 하겠다.

**경시적 저해시험(Progressive inhibition test)**

그림 1은 집과리 AChE에 대한 3종 저해제의 경시적 저해과정을 semilog plot으로 나타낸 것이며 이로부터 도출된  $\rho$ 와  $1/\rho-1/[I]$  plot (Lineweaver-Burk plot)은 표 3 및 그림 2에 각각 나타내었다.

그림 1의 semilog plot에 나타난 바 대로, DFP와 paraoxon의 경시저해선은 일직선으로서 preincubation 과정중에 spontaneous reactivation이 진행되지 않음을 시사하고 있으나 KH 501의 경우에는 저해선이 완만한 곡선을 보임으로서 상이한 양상이 관찰되고 있다.

일반적으로 경시적 저해가 1차반응속도를 따르지 않는 이유로는 spontaneous reactivation

**Table 2.  $I_{50}$  values of several organophosphates against housefly AChE with 10 minute inhibition time in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 7.5, 30°C**

Inhibitor	$I_{50(t=10min)}$ (nM)
DFP	259 (154-355) <sup>a</sup>
DDVP	8.7 (6.6-12.5)
Paraoxon	34.9 (28.8-41.9)
Parathion	513,000 (28,400-736,000)
KH 259	257 (169-354)
KH 263	614,000 (424,000-915,000)
KH 501	4.9 (3.8-6.9)
KH 502	114,000 (72,000-268,000)

<sup>a</sup> Confidence limit shown in parentheses.

Formulas of candidate compounds(KRICT Report, 1988)

KH259 : O,O-diethyl-O-(1-methyl-4-chloro-5-trifluoromethyl-3-pyrazoyl) thiophosphate

KH263 : O,O-diethyl-O-(1-methyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) thiophosphate

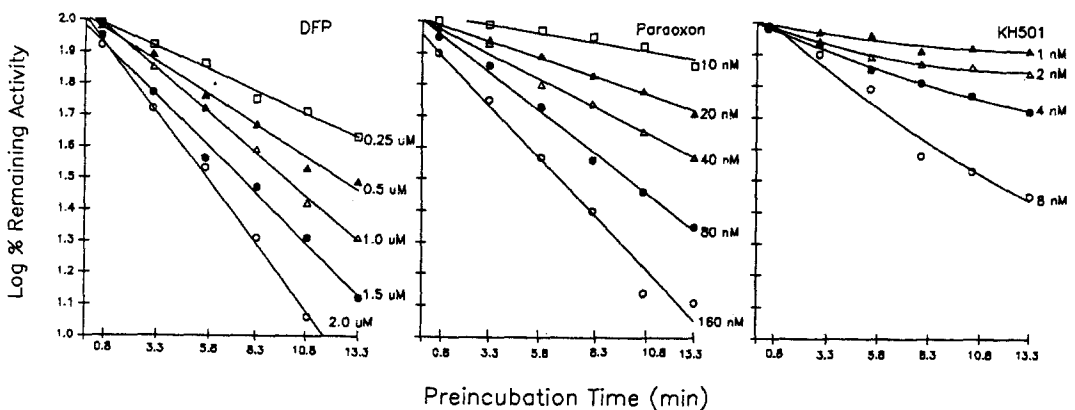
KH501 : O,O-diethyl-O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) phosphate

KH502 : O,O-diethyl-O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) thiophosphate

에 의한 경우 이외에도 반응액중의 저해제농도

가 효소농도에 비해 10배이상 높지 않은 경우를 들 수 있다(Aldridge & Reiner 1972).

Gordon et al. (1978)은 전기뱀장어 AChE의 active site 하나의 turnover number는  $6.5 \times 10^5$  /min이라고 보고한 바 있는데, 집파리 AChE의 경우에도 catalytic subunit는 동일하다는 가정하에 (Eldefrawi 1985) 같은 turnover number를 적용한다면 시험반응액중의 집파리 AChE는 0.11 U/ml로서 이는 분당  $1.1 \times 10^{-7}$  moles의 ATCh를 가수분해할 수 있음을 의미하므로 반응액중의 active site수는 rate/turnover number의 관계로부터  $1.7 \times 10^{-13}$ 개 정도로 계산되며 Mol 농도로 환산한다면  $1.7 \times 10^{-10}$ M 수준이 된다. KH 501의 공시농도는  $1 \sim 8 \times 10^{-9}$ M로서 효소농도에 비해 6~47배 높은 수준을 보이므로 낮은 저해제농도에 기인된 저해선의 굴곡 가능성은 배제해도 무방할 것이다. 결국, 집파리 AChE와 KH 501간의 저해반응시에는 spontaneous reactivation이 진행됨을 알 수 있다.



**Fig. 1. Time-course of inhibition of housefly AChE by three kinds of organophosphates.**

일차반응속도,  $\rho$ ,는 3종 공시화합물에 있어 공통적으로 농도와 직선적 비례관계를 나타내지 않음으로서 (표 3) Michaelis type 복합체의 형성을 추정할 수 있다. 따라서 전술된 방정식 (1)에 따라 저해가 이루어지며 방정식 (4)로

부터 각각의 저해상수를 도출해 낼 수 있다(그림 2). 표 3의  $\rho$ 값은 각각의 경시저해선(progressive inhibition line)의 기울기에 2.303을 곱한 값인데, 2.303은 상용 log를 자연 log로 전환시키는 과정에서 도출된 상수값이다.



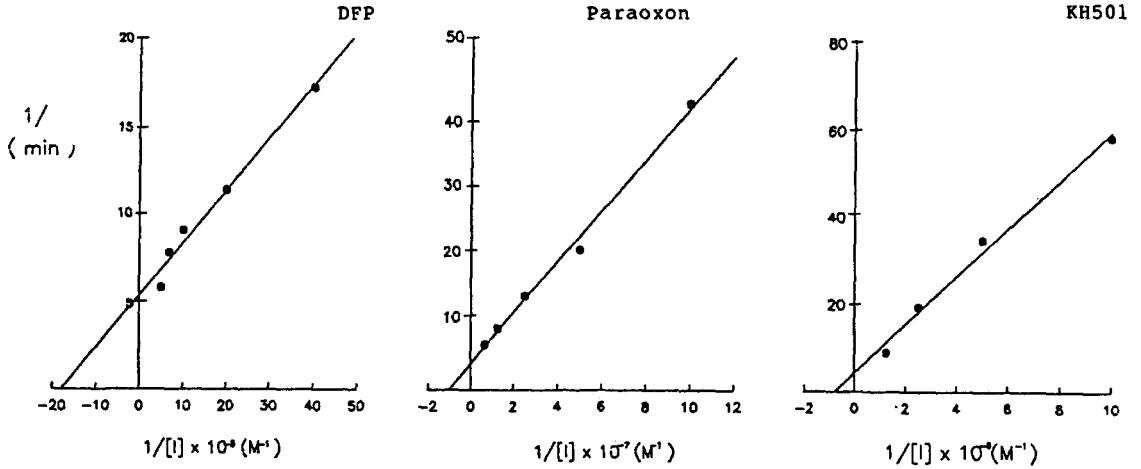


Fig. 2.  $1/\rho-1/[I]$  plots for progressive inhibition of housefly AChE by three kinds of organophosphates.

Table 3. Derivation of progressive inhibition line and  $\rho$  from semilog plot

Chemical	Conc. (nM)	Progressive inhibition line	$\rho(\text{min}^{-1})$
DFP	2000	$Y=2.0067-0.0863X, r=0.9904$	0.199
	1500	$Y=1.9828-0.0642X, r=0.9958$	0.148
	1000	$Y=2.0350-0.0551X, r=0.9903$	0.127
	500	$Y=2.0124-0.0437X, r=0.9938$	0.102
	250	$Y=2.0059-0.0290X, r=0.9955$	0.067
Paraoxon	160	$Y=1.9577-0.0680X, r=0.9897$	0.157
	80	$Y=2.0038-0.0499X, r=0.9965$	0.115
	40	$Y=2.0047-0.0326X, r=0.9926$	0.075
	20	$Y=2.0075-0.0216X, r=0.9968$	0.050
	10	$Y=2.0200-0.0106X, r=0.9537$	0.024
KH 501	8	$Y=2.0113-0.0454X, r=0.9848$	0.105
	4	$Y=1.9899-0.0208X, r=0.9934$	0.048
	2	$Y=1.9797-0.0115X, r=0.9578$	0.027
	1	$Y=1.9917-0.0069X, r=0.9310$	0.016

Table 4. Dissociation constants ( $K_d$ ), phosphorylation constants ( $k_3$ ) and bimolecular rate constants( $k_i$ ) of three organophosphates derived from progressive inhibition

Chemical	AChE <sup>a</sup>		$K_d(M)$	$k_3(\text{min}^{-1})$	$k_i(M^{-1}\text{min}^{-1})$	Relative value	
	source	Temp.(°C)				$k_i$	$I_{50}^b$
DFP	HF	30	$5.56 \times 10^{-7}$	0.214	$3.85 \times 10^5$	1	52.9
Paraoxon	HF	30	$9.64 \times 10^{-8}$	0.265	$2.75 \times 10^6$	7.1	7.1
Kh 501	HF	30	$1.27 \times 10^{-8}$	0.212	$1.67 \times 10^7$	43.4	1
DFP	BE	25	$1.2 \times 10^{-3}$	40.7	$3.4 \times 10^4$	—	—
Paraoxon	BE	25	$3.6 \times 10^{-4}$	43	$1.2 \times 10^5$	—	—

<sup>a</sup> AChE source : HF, housefly head AChE ; BE, bovine erythrocyte AChE.

<sup>b</sup> Date from Table 2.

<sup>c</sup> Data from Main and Iverson, 1966.

표 4에는 그림 2의 double-reciprocal plot으로부터 산출된  $K_d$ ,  $k_3$  및  $k_i$ 를 정리하였다. Paraoxon

과 DFP 등과 같은 강력한 AChE 저해제는 고농도 조건하에서 그 저해속도가 급속하므로 극

히 짧은 반응시간(m sec.~sec.)이내에서만이  $K_d$  및  $k_3$ 의 측정이 가능한 것으로 알려져 있다. Main & Iverson(1966)은 1~10초 사이의 반응시간하에서 DFP 및 paraoxon으로부터 각각의 저해상수를 계산하였는데 표 4에 제시된 바와 같이  $K_d$ 는  $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ M 정도이고  $k_3$ 는  $40$ ~ $43 \text{ min}^{-1}$  정도의 높은 수치를 보였다.

이에 반하여 낮은 농도인  $1 \times 10^{-9}$ ~ $2 \times 10^{-6}$ M 수준 및 0.8~13.3분의 장시간의 반응조건하에서 수행된 본 실험결과는 DFP 및 paraoxon의  $K_d$ ,  $k_3$ 가 각각  $9.6 \times 10^{-8}$ ~ $5.6 \times 10^{-5}$ M 및  $0.21$ ~ $0.27 \text{ min}^{-1}$ 로서 낮은 값을 보이고 있다.

저해제농도 및 저해시간에 따른  $K_d$  및  $k_3$ 의 이같은 차이는 Main(1969), Hastings et al.(1970) 및 Nishioka et al.(1976)에 의해 보고된 바 있다.

Main(1969)에 따르면 BuChE에 대한 amiton의  $K_d$  및  $k_3$ 는 고농도 조건하에서의 측정치가 저농도조건하에서의 그것보다 각각 83배 및 30배 정도 높게 나타났으며, Nishioka(1976)의 실험에서도 소적형구 AChE에 대한 isopropyl phenyl methyl carbamate의  $K_d$  및  $k_3$ 는 저농도 범위( $0.33$ ~ $1.66 \times 10^{-6}$ M)에서 보다 고농도조건( $2 \times 10^{-6}$ ~ $1 \times 10^{-4}$ M)에서 각각 32배 및 26배 정도로 높게 관찰되었다. 그러나  $K_d$  및  $k_3$ 의 증감율은 상호간에 거의 일정하여  $K_d/k_3$  관계의  $k_i$ 는 일정하게 조사되었다.

Nishioka et al.(1976)은 이러한 농도차이에 의한 저해상수의 변동현상을 Lineweaver-Burk plot 상에서 고농도 범위에서의 'downward drift'라 칭하였으며, 이는 고농도 조건하에서는 Michaelis 복합체의 해리상수,  $K_d$  및 이로부터의 phosphorylation 속도상수  $k_3$ 보다는 공히 높은 값을 가지는 저해제-AChE-저해제 '복합체'의 해리상수,  $K_d'$ 와 이로부터의 phosphorylation 속도상수,  $k_3$ 가 속도제한요인(rate limiting factor)이 되어 저해반응의 전반을 지배하기 때문인 것으로 추측하였다.

따라서 Nishioka et al.(1976)의 견해에 따르면, 본 실험에서와 같이 저농도조건하에서의

반응에 있어서는 낮은 저해제농도에 기인된 allosteric binding의 희박한 가능성 때문에 전형적인 Michaelis 복합체의 형성과 phosphorylation에 관여하는  $K_d$  및  $k_3$ 의 효소동태(kinetics)가 보다 우세하여 높은 친화력( $1/K_d$ )과 낮은 phosphorylation 속도가 관찰되는 것으로 생각된다.

이상으로부터 본 실험결과는 고농도 조건하에서 측정된 저해상수들과의 직접적인 비교는 곤란하지만 동일조건내에서 산출된 개개 저해제간의 상대적 비교는 충분한 타당성을 가질 것으로 여겨진다. 저해상수의 화합물간 비교에 있어서 저해력( $k_i$ )간의 차이는 DFP와 paraoxon에 비해 각각 43배 및 6배 정도의 뛰어난 저해력을 보이고 있다. 또한 이러한 저해력( $k_i$ )의 차이는 각 화합물간에 거의 유사하게 조사되는  $k_3$ 의 차이(1 : 1.2 : 0.99)보다는 1 : 5.8 : 43.8의 비로서 고도의 상관성을 보이는 친화력( $1/K_d$ )의 차이에 기인된 것으로 나타남으로서 유기인계의 저해반응에 있어서  $K_d$  보다는  $k_3$ 가 보다 중요한 저해요인이 된다는 일반적인 정설과는 상이한 양상을 보이고 있다.

한편,  $k_3$ 와  $I_{50}$ 의 관계에 있어서도 각 화합물의 비가 각각 1 : 7.1 : 43.4 및 1 : 7.1 : 52.9로서  $k_3$ 와  $I_{50}$ 간에는 고도의 상관성이 존재함을 알 수 있는데 이는  $k_i$ 가 시험화합물의 저해특성뿐만 아니라 그 저해력의 조사에도 무척 유용한 지수로 사용될 수 있음을 시사하는 것이라 하겠다. 그러나 *in vitro* AntiChE스크리닝의 1차단계에 있어서는 시험화합물의 AChE 저해가 방정식 (5)에 의해 진행됨이 전제될 경우를 제외하고는  $k_i$ 의 산출에 보다 많은 시간이 소요되는 경시적저해시험이 요구되므로  $k_i$ 를 1차스크리닝단계에서의 저해력지수로 사용하는 것은 불합리한 것으로 보인다.

그러나  $K_d$ ,  $k_3$  및  $k_i$ 등과 같은 저해상수의 조사를 위한 경시적 저해시험은 고정시간 저해시험의 1차스크리닝단계에서 고도의 AChE 저해력이 인정된 유사화합물들간의 구조차이에 기인된 저해특성의 파악 및 분자생물학적 저해기

구의 예측에 필연적인 2차적 과정으로서 이로부터의 생합리적 분자설계(Biorational drug design)에 필요한 기초정보의 도출이 가능할 것으로 생각된다.

### 인 용 문 헌

- Aldridge, W.N. 1950. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition of diethyl p-nitrophenyl thiophosphate(E605) and analogues. *Biochem. J.* 46 : 451~460.
- Aldridge, W.N. & E. Reiner. 1972. Enzyme Inhibitors as Substrates Interactions of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamiz Acids. North Holland Publishing Company, Amsterdam. pp328.
- Booth, G.B. & A. Lee. 1971. Distribution of cholinesterases in insects. *Bull. World Health. Org.* 44 : 91~107.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248~251.
- Fersht, A. 1985. Enzyme Structure and Mechanism. W. H. Freeman and Company, New York. pp475.
- Gordon, M.A., D.E. Carpenter & I.B. Wilson. 1978. The turnover numbers of acetylcholinesterase forms. *Mol. Pharmacol.* 14 : 266~270.
- Hastings, F.L., A.R. Main & F. Iverson. 1970. Carbamylation and affinity constants of some carbamate inhibitors of acetylcholinesterase and their relation to analogous substrate constants. *Agri. Food Chem.* 18 : 497~502.
- 한국화학연구소. 1988. 신규농약개발에 관한 연구 (II).
- 한국화학연구소. 1990. KC-6137 개발에 관한 연구.
- Hutson, D.H. & T.R. Roberts. 1985. *Insecticides*, vol.5 John Wiley & Sons Ltd. New York. pp 385.
- 李時赫, 李俊浩, 趙匡衍. 1990. *In Vitro* anticholinesterase 스크리닝을 위한 집파리 및 3종 곤충으로부터의 acetylcholinesterase의 추출. *韓應昆誌.* 30 : 18~28.
- Main, A.R. 1964. Affinity and phosphorylation constants of the inhibition of esterases by organophosphates. *Science.* 144 : 992~993.
- Main, A.R. 1969. Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterases based on inhibition by organophosphates. *J. Biol. Chem.*, 244 : 827~840.
- Main, A.R. & F. Iverson. 1966. Measurement of the affinity and phosphorylation constants governing irreversible inhibition of cholinesterase by di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem. J.* 100 : 525~531.
- Nishioka, T., K. Kitumura, T.Fujita & M. Nakajima. 1976. Kinetic constants for the inhibition of acetylcholinesterase by phenyl carbamates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6 : 320~337.
- Ware, G.W. 1983. *Pesticides. Theory and Application.* W.H. Freeman and Company, New York. pp 308.
- Wilson, I.B. & F. Bergmann. 1950. Acetylcholinesterase III Dissociation constants of active groups. *J. Biol. Chem.* 186 : 683~692.

(1992년 1월 6일 접수)