

벼 잎집무늬 마름병균 (*Rhizoctonia solani* Kühn)에서 분리한 Succinate Dehydrogenase (SDH) 에 대한 *N*-치환 phenyl 1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide 유도체의 효소활성저해

김 용 환

동양화학공업(주)

초 록 : 18 종의 *N*-치환 phenyl 1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide 를 합성하여 벼 잎집무늬 마름병균 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 에 대한 군사생육억제력 (pEC_{50}) 과 이 균에서 분리한 succinate dehydrogenase (SDH) 의 효소활성 저해력 (pI_{50}) 을 측정하였다. 구조-활성 상관연구를 통해 군사생육억제력이 SDH 효소저해력과 소수성인자인 chromatographic capacity factor (k') 에 의해 79% 까지 유의성 있게 해석되었으며 이는 합성한 화합물의 주작용점이 SDH 이고 생체내에서 작용점까지 도달하는데 필요한 소수성성질이 살균력의 발현에 중요한 인자임을 보여준다.(1997년 10월 6일 접수, 1997년 10월 21일 수리)

서 론

생명체의 에너지원이 되는 ATP 는 전자전달에 의한 산화, 환원 반응과 ATP synthetase 에 의한 ADP 의 인산화 반응을 거쳐서 합성된다. 호흡을 통한 전자전달계는 미토콘드리아의 내막의 사이에 있으며, 전자전달 반응을 통하여 NADH 나 succinate 를 기질로 하여 ATP 를 높은 수율로 합성하게된다. 미토콘드리아의 전자전달을 단계별로 저해하는 물질들은 살균력있는 물질로 개발되었고, 특히 carboxamide 계 살균제는 미토콘드리아의 complex II (succinate ubiquinone reductase) 에 작용하여 살균활성을 보이는 물질로 1966년에 carboxin 과 oxycarboxin 이 합성되어 작물에 병을 야기하는 Basidiomycetes 에 특이적으로 작용하여 식물병을 방제하였다.^{1,3)}

Carboxin 은 oxathiin ring 과 crotonic acid(CH₃=CH-CONH-) 형태로 amide 기를 포함하고 있는데 methyl 기와 amide가 *cis* 배열을 하고 있어 이 부분이 toxophore 로 작용하게 되며^{4,5)} 기타의 다른 carboxamide 계 살균제에서도 같은 배열이 활성에 중요하다.⁶⁻¹⁰⁾ Mathre¹¹⁾는 미토콘드리아 NADH 가 산화합에도 불구하고 acetate 가 대사되지 않는 사실에 근거하여 carboxin 은 succinate dehydrogenase (SDH) 를 저해한다고 주장했다. SDH 는 complex II 에 위치하며 flavin-전구체와 환원된 flavin 에서 ubiquinone 으로 전자전달에 관여하는 non-heme iron component 로 구성되어 있으며 이때 carboxamide 계 살균제가 SDH 의 iron-sulfur component 에 위치하여 전자전달 흐름을 방해한다는 Lyr¹²⁾ 와 Kuhn⁴⁾ 의 주장이 일반적으로 받아들여지고 있다.

본 연구에서는 18 종의 1,3,5-trimethyl pyrazole-4-carboxamide 유도체를 합성하여 벼 잎집무늬 마름병균(*Rhizoctonia solani* Kühn)에서 분리한 SDH 에 대한 활성 저해력을 측정하였다. SDH 활성은 인공적인 전자수용체인 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP)의 환원 속도를 이용하여 측정하였고, *R.solani* 의 군사생육저해와 SDH 활성저해간의 상관관계를 물리화학적 변수를 이용하여 비교하였다.

재료 및 방법

재료

생리활성 검정실험을 위한 벼 잎집무늬 마름병균 (*Rhizoctonia solani* Kühn)을 서울대학교 농업생명과학대학 농생물과에서 분양받았으며, potato dextrose agar(PDA, Difco co, USA)배지에서 배양(암조건하에서 25°C) 하여 공시균주로 사용하였다. 한편 potato sucrose broth 에서 암 조건으로 25°C에서 14일간 진탕배양하여 얻은 균사를 미토콘드리아 분리에 이용하였다.

시약 및 기기

DCPIP 와 bovine serum albumin(BSA) 는 Sigma 사 (USA)에서 구입하였으며, 단백질 정량을 위한 Bio-Rad protein assay 시약은 Bio-Rad 사(USA)에서 구입하여 사용하였다. grinding medium 은 sucrose 0.25M, sodium ethylenediamine tetra(acetic acid) 5 mM 과 BSA(1.5 g/liter)를 넣고 pH를 7.0으로 보정하여 사용하였다. washing medium 은 grinding medium 에서 BSA 만을 제거하고 조제하였다. 흡광도측정은 Cary 118-C spectrophotometer (Varian,

찾는말 : *N*-치환 phenyl 1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide, 벼 잎집무늬 마름병균, 군사생육억제력, succinate dehydrogenase.

*연락처

USA) 으로 하였으며 SDH의 분리는 bead beater chamber (Biospec product, USA) 와 원심분리기(Beckman Model J-21 centrifuge with rotor type JA-20) 로 하였다. 소수성층정은 Waters 590 EF (USA)를 이용하였으며 column 은 ODS (Waters, i.d. 3.9×250 mm, 5 μm pore size) 이었다. 이때의 용매조성은 methanol:물 (8:2, v/v), 유속은 0.8 ml/min, 측정파장은 241 nm 이었다. 화합물의 구조확인 은 ¹H-NMR (Bruker AM 300LL, Germany) 와 IR spectrophotometer (Perkin Elmer 1420, USA) 를 이용하여 확인하였고 용점은 Büchi 535 (Swiss) 용점측정기를 이용, 모세관으로 측정하였으며 보정하지 않았다.

N-치환 phenyl 1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide 유도체의 합성^{7,13,14)}

18 종의 N-치환 phenyl 1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide 유도체를 Fig. 1 과 같은 방법으로 합성하였고 methanol에서 재결정한 후 생리활성검정에 사용하였다.

균사생육억제 실험

균사생육억제 실험은 4개 농도(90, 45, 22.5, 11.3 ppm)에 대해 한천 평판 희석방법(agar plate dilution method)를 이용하였다. PDA 배지에서 배양된 공시균의 균총원판(7 mm)을 취하여 약액 배지 중앙에 올려놓고 25°C 에서 60시간 배양한 후 균사생장의 억제정도를 조사하였다. 각 농도 별로 3 반복 처리한 후 평균을 구하였으며 같은 방법으로 무처리구의 균사생장정도를 측정하여 Eq. 1 과 같이 균사생장억제율을 산출하였다.

$$\text{균사생장 억제율(\%)} = (a - b) / a \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

a : 무처리구의 평균 균총직경(mm)
b : 처리구의 평균 균총직경(mm)

각 화합물의 생리활성정도는 각 약제의 생육저해율(%)을 probit 수치로 전환한 다음 처리농도(μM)의 대수값에 대해 plotting, probit 값이 5 (50% 저해에 해당하는 probit 값)에 대응하는 농도값으로 EC₅₀(μM)을 구하였다.

SDH의 분리 및 활성 측정

PSB 에서 배양한 균사를 grinding medium 에 넣고 bead

beater chamber 에서 2분간격으로 30초 동안 마쇄한 후 (4회 반복) 4겹의 cheese cloth로 걸러서 걸른액을 4°C 에서 5,000 g 로 15분간 원심분리하였고 상등액을 다시 10,000 g 로 20분간 원심분리하여 침전물을 washing medium 으로 희석하였다. 희석용액을 glass tissue homogenizer 로 마쇄하고 20,000 g 에서 10분 동안 다시 원심분리하여 미토콘드리아 pellet을 얻었다. 이 pellet 를 단백질정량과 SDH 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford method¹⁵⁾ 에 의하여 정량하였고 이때 단백질 함량이 2-2.5 mg/ml 가 되도록 pellet 을 희석하여 SDH 활성측정에 사용하였다. SDH 의 활성측정은 sample cell 에 potassium phosphate (50 mM, pH 7.0), KCN (1 mM), DCPIP (45 M) 및 disodium succinate (17 mM) 과 acetone 에 녹인 화합물 용액 (20 l) 를 가한 후 미토콘드리아 용액 (0.1 ml) 를 넣어 최종부피가 2.5 ml 로 되게하여 600 nm 에서의 흡광도로 비교하였다. 화합물의 최종농도는 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 및 10.0 ppm 이 되게 하였으며 acetone 의 농도는 10 ml/l 가 넘지 않게 유지하였다. Reference cell 에는 DCPIP 와 succinate 를 넣지않은 상태에서 흡광도를 측정하여 보정하였다. DCPIP 환원시 extinction coefficient 를 2.1×10⁴/M cm 로 하여 specific activity 를 계산하였고, control 의 활성은 18-28 nmol DCPIP/min mg protein 으로 유지하였다. 50% 효소활성저해를 나타내는 몰농도(I₅₀)은 DCPIP 환원 속도를 50% 저해할 수 있는 농도로서 활성저해율(%)의 probit 값 과 화합물 농도(μM)의 직선회귀식을 통해 얻었다.

합성화합물의 소수성 측정^{7,16)}

역상 ODS column 이 부착된 HPLC 를 이용하여 합성화합물의 소수적 성질을 측정하였고 HPLC 상의 머무름 시간 (min)으로 부터 아래 Eq. 2 의 chromatographic capacity factor (k')를 구하였다.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad \text{Eq. 2}$$

여기서 t_R 는 화합물의 머무름 시간 (min), t₀ 는 column 내에서 머무르지 않는 비고물질 (indigo carmine) 의 용출 시간을 나타낸다.

결과 및 고찰

합성한 18 종의 N-치환 phenyl 1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamide 의 구조식, 분자량, 용점, log k', 균사생육저해력(pEC₅₀)과 SDH 활성저해력 (pI₅₀) 은 Table 1 에 수록하였다. 합성한 화합물의 구조는 ¹H-NMR 과 IR spectra 로 확인하였으며 용점은 기존보고⁷⁾와 일치하였다. 김⁷⁾ 은 carboxamide 계 살균제의 경우 균사생육억제와 포장시험결과가 일치하는 것을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 균사생육 저해실험으로 포장시험을 대신하였다.

균사의 생육억제력과 SDH 활성저해력간의 상관관계를 통계 software 인 Statgraphics¹⁷⁾의 다중회귀분석 program

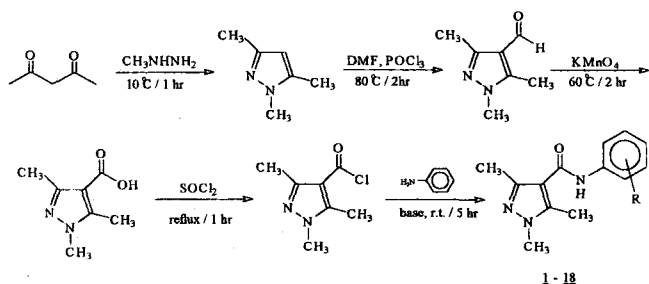


Fig. 1. Synthetic route of N-substituted phenyl-1,3,5-trimethylpyrazole-4-carboxamides.

Table 1. Structures and inhibitory activity of *N*-substituted phenyl 1, 3, 5- trimethylpyrazole-4-carboxamides against Succinate Dehydrogenase (SDH) isolated from *Rhizoctonia solani* Kühn.

Compound	R	Formula	M.W.	log <i>k'</i>	m.p.(°C) ⁷⁾	pEC ₅₀	pI ₅₀
1	H	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O	229.28	0.30	150-152	4.71	5.56
2	2-Cl	C ₁₃ H ₁₄ ClN ₃ O	263.74	0.49	132-133	4.50	5.35
3	2-OH	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245.29	0.16	235-240	3.20	5.33
4	2-NO ₂	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₃	274.29	0.53	169-172	4.15	4.68
5	2-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂	259.31	0.48	130-132	4.39	5.15
6	3-Cl	C ₁₃ H ₁₄ ClN ₃ O	263.74	0.44	154-156	4.87	5.92
7	3-OH	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245.29	0.19	228-232	3.50	4.99
8	3-CH ₃	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O	243.31	0.37	159-160	5.74	6.21
9	3-NO ₂	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O ₃	274.29	0.35	187-191	3.84	4.53
10	3-OC ₂ H ₅	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₂	273.34	0.38	154-156	5.82	6.04
11	3-OC ₄ H ₉	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₂	301.39	0.60	117-119	5.29	5.96
12	3-OCH(CH ₃) ₂	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₂	287.36	0.43	77-80	5.97	6.15
13	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O	243.31	0.37	169-170	4.57	5.53
14	4-OC ₂ H ₅	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₂	273.34	0.35	149-151	3.76	5.25
15	4-OH	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245.29	0.16	236-240	3.30	4.71
16	4-Cl	C ₁₃ H ₁₄ ClN ₃ O	263.74	0.43	200-203	4.12	4.71
17	4-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂	259.31	0.29	182-184	3.72	5.38
18	4-OCH(CH ₃) ₂	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₂	287.36	0.39	145-147	3.66	4.91

을 이용하여 분석한 결과 Eq. 3 에서와 같이 *r*² 값이 0.65 로 이 화합물에 의한 균사의 생육억제가 SDH 의 활성저해에 기인하는 것으로 나타났다.

$$\log (1 / EC_{50}) = 1.32 (0.23) \log (1 / pI_{50}) - 2.67 (1.23) \quad \text{Eq. 3}$$

(*n* = 18, *s* = 0.51, *r*₂ = 0.65, *F* = 33.20, *P* = 0.0001)

여기서 괄호안의 수는 표준오차를 *n* 은 통계에 사용된 화합물의 개수, *r* 은 자유도가 보정된 상관계수, *s* 는 표준오차, *F* 는 *F*-test 통계치, *P* 는 유의수준을 의미한다. 이 상관식에 화합물이 확산을 통해 작용점까지 도달하는 소위 'random walk'¹⁸⁾ 에 관여하는 소수성 인자인 log *k'* 를 도입하였다. 김⁷⁾ 은 *N*-치환 phenylpyrazole 4-carboxamide 의 화합물을 대상으로 이들의 역상 HPLC 상의 chromatographic capacity factor 의 대수값인 log *k'* 이 물과 octanol 과의 분배계수의 대수값인 log *Pow* 와 높은 상관관계 (*r*²=0.98)를 갖고있음을 발표한 바 있다. 이 소수성인자를 상관식에 도입하여 분석한 결과 *r*² 값이 0.79 로 증가함을 보여주었다.

$$\log (1 / EC_{50}) = 1.18 (0.19) \log (1 / pI_{50}) + 2.71 (0.83) \log k' - 2.91(0.97) \quad \text{Eq. 4}$$

(*n* = 18, *s* = 0.40, *r*² = 0.79, *F* = 32.11, *P* = 0.0001)

Eq. 4 는 화합물 3, 7, 15 등에서 나타나는 바와 같이 소수성이 낮아 생체막등에서의 이동도가 떨어지는 물질들이 직접적으로 작용점인 SDH 의 활성저해에는 높은 활성을 보이는 사설을 설명해준다. log *k'* 의 최적값이 존재할 것으로 예측하여 (log *k'*)²를 상관식에 도입한 경우 전체 상관식의 *r*² 값은 0.80 으로 증가하였으나 유의성이 5% 수준을 벗어나 상관식에서 제외하였다. 이는 합성한 화합물의 범위내

에서는 log *k'* 값이 클 경우 작용점으로서의 유효도달이 높다는 점을 의미한다. 이상의 결과는 carboxamide 계 화합물의 살균력 검증연구시 SDH 의 활성저해와 소수성 평가만을 통해서도 *in vivo* 에서의 결과를 80% 수준까지 해석할 수 있음을 보여준다.

참고문헌

1. Von Schmeling, B. and M., Kulka (1966) Systemic fungicidal activity of 1,4-oxathiin derivatives, *Science*, **152**, 659.
2. White, G. A. (1971) A potent effect of 1,4-oxathiin systemic fungicides on succinate oxidation by a particulate preparation from *Ustilago maydis*, *Biochemical and biophysical research communications*, **44**(5), 1212.
3. Coles, C. J., H. D. Tisdal, W. C. Kenney, and T. P. Singer (1972) Studies on succinate dehydrogenase X XI. Quaternary structure of succinate dehydrogenase. *Physiol. Chem. and Physics*, **4**, 301.
4. Kuhn, P. J. (1983) Mode of action of carboxamides, in "Mode of action of antifungal agents"(Ed. Trinci, A. P. and Pyley, J. F.), Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 155.
5. Ten Haken, P. and C. L., Dunn (1971) Structure-activity relationships in a group of carboxamides systemically active against broad bean rust (*Uromyces fabae*) and wheat rust (*Puccinia recondita*), in *Proc. 6th Br. Insectic. Fungic. Conf.*, **2**, 453.
6. Huppatz, J. L., J. N. Phillips, and B., Witrzens (1984) Structure-activity relationships in a series of fungicidal pyrazole carboxanilides, *Agric. Biol. Chem.*, **48**(1), 45.
7. Kim, Yong Whan (1992) Synthesis and quantitative structure-activity relationship of *N*-substituted phenylpyrazole-4-carboxamides, Ph. D. Thesis of Seoul National University, Seoul, Korea.

8. Carter, G. A., J. L. Huppatz, and R. L. Wain (1976) Investigations on fungicides XI X. The fungitoxicity and systemic antifungal activity of certain pyrazole analogues of carboxin, *Ann. appl. Biol.*, **84**, 333.
9. Coles, C. J., J. P. Christopher Singer, G. A. Thomas White, and G. D. Thorn (1978) Studies on the binding of carboxin analogs to succinate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **253**(16), 5573.
10. Phillips, W. G. and J. M. Rejda-Heath (1993) Thiazole carboxanilide fungicides : A new structure-activity relationship for succinate dehydrogenase inhibitors, *Pestic. Sci.*, **38**, 1.
11. Mathre, D. E. (1971) Mode of action of oxathiin systemic fungicides : Structure-activity relationships, *J. Agric. Food Chem.*, **19**(5), 872.
12. Lyr, H. (1987) in "Modern selective Fungicides" (Ed. Lyr, H.), Longmans, NY. p 63.
13. Kim, Y. W., C. H. Park, W. S. Choi, Y. C. Kwon, and C. K. Park (1989) Synthesis and antifungal activity of 1,3-substituted 5-chloropyrazole-4-carboxylic acid oxime ester, *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*, **32**(4), 401.
14. Kim, Y. W., W. B. Jeon, and C. K. Park (1992) Synthesis and antifungal activity of N-substituted 5-chloro 1,3-dimethylpyrazole-4-carboxamides, *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*, **35**(2), 87.
15. Compton, S. T. and C. Jones (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal. Biochem.*, **151**, 369.
16. Leo, A., C. Hansch, and D. Elkins (1971) Partition coefficients and their uses, *Chemical Reviews*, **71**, 525.
17. Statgraphics, version 4.0, STSC (1989).
18. Silverman, R. B. (1992) in "The organic chemistry of drug design and drug action" Academic Press, San Diego, USA. p 26.

Structure-Activity Relationships of Fungicidal *N*-Substituted Phenyl 1,3,5- Trimethylpyrazole-4-carboxamides in the Inhibition of Succinate Dehydrogenase (SDH) Isolated from *Rhizoctonia solani* Kühn.

Yong-Whan Kim (*R&D Team, Agro Div., Oriental Chemical Industries, 50 Sokong-Dong, Chung-Ku, Seoul 100-718, Korea*)

Abstract: Eighteen *N*-substituted phenyl 1, 3, 5-trimethylpyrazole-4-carboxamides were synthesized to screen for their mycelial growth inhibition activity against *Rhizoctonia solani* Kühn (pEC_{50}) and to measure enzymatic inhibition activity of these compounds (pI_{50}) against succinate dehydrogenase (SDH) isolated from *R. solani* Kühn. A structure-activity relationship formulated by regression analysis showed that 79% of the variance in mycelial growth inhibition activity can be explained with SDH inhibition activity and chromatographic capacity factor (k') as a hydrophobic parameter related to the penetration and transport processes in the biological system.

Key words: *N*-substituted phenyl 1, 3, 5-trimethylpyrazole-4-carboxamide, succinate dehydrogenase, *Rhizoctonia solani* Kühn, mycelial growth inhibition.

* Corresponding author