

· 专论与综述 ·

除草剂靶标酮醇酸还原异构酶(KARI)研究进展

王宝雷, 李正名*

(南开大学 元素有机化学研究所, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要: 酮醇酸还原异构酶(KARI)是植物和微生物体内支链氨基酸生物合成的关键酶之一, 可以作为设计除草剂的靶标, 通过抑制酶的活性中断支链氨基酸的合成使植物死亡, 达到除草目的。文章综述了KARI的催化性质、晶体结构以及作为除草剂靶标的研究现状。

关键词: 酮醇酸还原异构酶; 除草剂; 靶标

中图分类号: S482.4; Q55 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2004)01-0011-06

Progress of Ketol-acid Reductoisomerase (KARI) as Herbicidal Target

WANG Bao-lei, LI Zhengming*

(Elemento Organic Chemistry Institute, State-Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Ketol-acid reductoisomerase (KARI) is a promising target for the design of herbicides because it is another essential enzyme for the synthesis of branched-chain amino acids in plants and microorganisms yet absent in animals. The catalytic properties, X-ray crystallography of the enzyme and the studies on the enzyme as a novel herbicidal target are described.

Key words: Ketol-acid reductoisomerase; herbicide; target

在植物和微生物(如细菌)体内, 支链氨基酸——缬氨酸(V al)、亮氨酸(L eu)及异亮氨酸(I le)的生物合成是至关重要的, 哺乳动物体内缺乏这几种氨基酸的生物合成能力, 因此通过阻止杂草体内支链氨基酸的合成, 可使杂草死亡而对人畜无害, 这就成为设计对“环境友好”除草剂的主要出发点。

植物体内缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成路径见图^[1,2], 其中包含几个特殊的反应和酶。前3步反应分别需要3种酶来催化: 乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS或乙酰羟乙酸合成酶, acetohydroxy acid synthase, AHAS)、酮醇酸还原异构酶(ketol-acid reductoisomerase, KARI或乙酰羟乙酸异构还原酶, acetohydroxy acid isomeroeductase, AHIR)以及二羧基酸脱水酶(dihydroxy

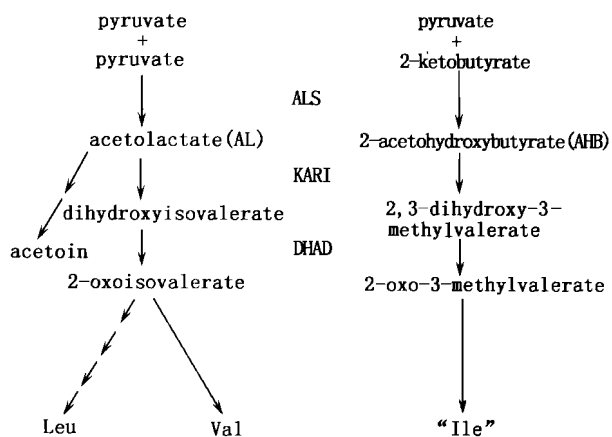


Fig 1 The biosynthetic pathway of branched-chain amino acids

收稿日期: 2003-03-31; 修回日期: 2003-06-23

作者简介: 李正名(1931-), 男, 上海人, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 主要从事农药化学研究

*联系电话: 022-23503732; E-mail: zm1@nankai.edu.cn

基金项目: 国家 863 农业与生物技术项目(2001AA 235011B)。

acid dehydratase, DHAD)。这些酶都可以作为设计除草剂的靶标,通过抑制酶的活性中断支链氨基酸的合成使植物死亡,达到除草目的。

以ALS为靶标设计除草剂的研究已经很多,高活性的抑制剂主要是磺酰脲类(sulfonylureas)^[3]和咪唑啉酮类(imidazolinones)^[4]化合物。酮醇酸还原异构酶(以下简称为KARI)则是研究较少的一个靶酶,相关的文献报道不多见,笔者着重从酶的催化性质、抑制剂及抑制机理、晶体结构等几方面对其进行综述。

1 酶的获得及基因编码

目前供研究使用的KARI有来自*Escherichia coli*的^[5],也有从菠菜或大麦叶绿体中提取并在*E. coli*中过量表达,经纯化后使用^[6,7]。

在细菌、真菌以及植物中可以观察到KARI的活性,在动物体内则没有。KARI是多个物种的同源物,因此许多KARI的基因和蛋白序列存在于不同的数据库中,尽管如此,但在生物化学上加以表征的例子却很少。

植物、细菌和真菌中KARI在每个组织中是由单个基因编码的。*E. coli*酶的表达是由底物AL或AHB与一个*ilvY*基因编码的激活剂结合所诱导^[8,9]。在酵母中,KARI的表达受氨基酸专一性调控^[10]。真菌和植物酶则是由每单倍体基因组中一个核基因编码,而蛋白质分别被转移到线粒体和质体中^[6,10,11~13],例如菠菜和拟南芥*A. thaliana*。在缺少线粒体的厌氧真核生物*Piranyces sp. E2*中,酶是胞质^[14]。酵母酶还有与其催化活性无关的另一功能,即稳定线粒体DNA^[15]。当然,与催化活性无关的第二功能并非仅此一例,其它的例子如在不同过程中的醛脱氢酶、转酮酶、作用为透视镜晶体蛋白(lens crystallins)的谷胱甘肽S-转位酶(glutathione S-transferase)、形成真菌胞质纤丝的丙酮酸脱羧酶以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用等。KARI稳定线粒体DNA的机理,以及KARI能够发挥这一功能的原因目前尚不清楚。

2 酶的催化性质

KARI催化反应的具体过程见图2。

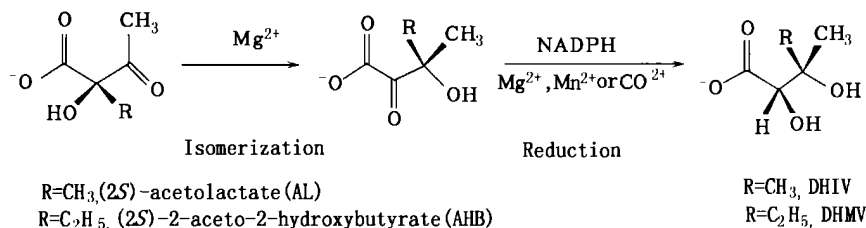


Fig 2 The reaction catalyzed by KARI

反应的底物是2-乙酰乳酸(AL)或2-乙酰-2-羟基丁酸(AHB),两种产物则分别是缬氨酸和亮氨酸或异亮氨酸合成的前体。KARI催化的反应以两步进行:第一,异构化反应。其中包含在底物C2和C3之间烷基迁移,得到3-羟基-2-氧-异戊酸(HMOV)或3-羟基-3-甲基-2-氧-戊酸(HMPV);第二,还原反应。中间体由辅助因子NADPH还原得到最终产物DHIV或DHMV(伴随着NADPH氧化为NADP⁺)^[16]。Dumas等人^[17]提出了KARI的反应机理,如图3所示。首先,蛋白质中的某个碱基或与Mg²⁺配位的羟基氧从底物羟基上夺走质子,然后烷基迁移。由于Mg²⁺的诱导更利于羰基的极化,这使得烷基从C2到C3的迁移变得容易。最后,发生NADPH中质子的转移,这次是第二个Mg²⁺通过诱

导效应使C2上带有较多正电荷而促进了反应。

细菌和植物的KARI对两种底物AL和AHB的催化仅限于S异构体^[18,19]。KARI对AL和AHB具有相似的K_m,但对AHB的活性较之AL高5~8倍^[6,20]。因为KARI将优先合成能够产生异亮氨酸(Ile)的中间物,这一性质在调节合成不同的支链氨基酸的比例上非常重要^[21]。

还原步骤需要氢原子从NADPH中的转移。KARI对NADPH较优于NADH,前者的K_m为2~15 μm,而后者为100~600 μm^[6,22,23]。与细菌KARI不同的是,植物KARI被NADP⁺强烈抑制,K_i为5 μm^[6]。

KARI的催化作用绝对需要Mg²⁺参与,并且在*E. coli*中没有其它二价金属离子能够有效地替

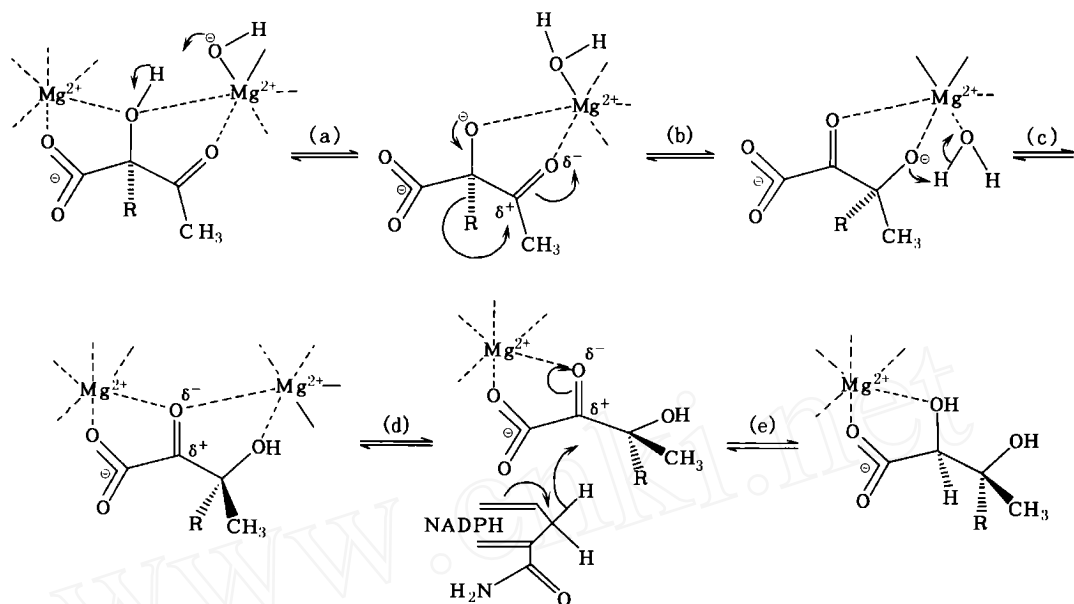


Fig 3 Proposed mechanism for catalyzed reaction of KAR I

代^[16]。菠菜酶对 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 具有微弱活性,大约3%^[17,24]。植物酶比细菌和真菌KARI对 Mg^{2+} 具有较高的亲和力,分别为 $5\ \mu m$ 和 $400\sim 900\ \mu m$ ^[17]。

研究植物KARI的反应机理曾使用3种方法:位点导向诱变法(site-directed mutagenesis)^[17],晶体学方法^[24,25]和分子模拟法^[26]。这3种方法互为补充。通常认为KARI催化反应是以两步进行的。

3 KAR I抑制剂及抑制机理

3.1 Hoe 704和IpOHA

KARI能被许多物质抑制,包括底物的类似物如2-甲基乳酸和3-氨基吡啶-NADP⁺,二价金属离子如 Mn^{2+} ,以及反应产物^[16,19,20,27]。而人们关注最多的抑制剂是反应中间物的类似物2-二甲基膦酰基-2-羟基乙酸盐(2-dimethylphosphinoyl-2-hydroxyacetate, Hoe 704)^[5]和N-羟基-N-异丙基草酰胺盐(N-hydroxy-N-isopropyl oxamate, IpOHA)^[28],如图4所示。这两个化合物近乎不可逆抑制KARI,二者均与底物相互竞争,例如Hoe 704

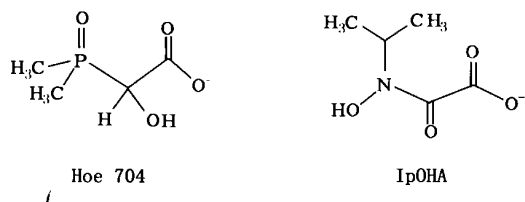


Fig 4 Structures of Hoe 704 and IpOHA

作用植物后,会引起AL和3-羟基-2-丁酮(aceto in, 乙酰乳酸AL脱羧产物)的积累^[5],IpOHA也会出现类似反应底物增多的现象。

在对KARI的抑制效果上,Hoe 704和IpOHA都是时间依赖性的(time-dependent),即抑制效果是随时间的延长而增强,例如Hoe 704是一个单子叶植物及双子叶植物的非选择性除草剂^[29],给植物施药Hoe 704的第一反应就是能够迅速抑制植物生长,而过几天后才能渐渐观察到中毒症状。KARI抑制剂虽然是一个紧密结合的复合物,但其形成是一个缓慢的过程^[28,30]。另外,Hoe 704比IpOHA结合到植物酶上快10倍,结合速率常数(association rate constants)分别为 $2.2 \times 10^4\ mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$ 和 $1.9 \times 10^3\ mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$ ^[30],并且Hoe 704比IpOHA表现为一个较好的除草剂。虽然二者都能使植物死亡,但是实际应用时获得除草效果所需要的浓度远远高于在体外KARI试验中所建议的浓度,例如IpOHA的应用率为 $2000\ g/hm^2$ 。另外,Grandoni等^[31]曾报道KARI抑制剂Hoe 704和IpOHA在抑制tuberculosis临床耐药致病菌方面比抑制菌株ATCC 35801更为有效,ALS抑制剂也具有类似结果。因此,这些支链氨基酸生物合成抑制剂有望成为新型的抗结核药剂。

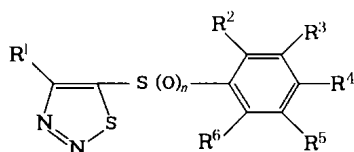
文献中提到二者结合到植物KARI上的速率和除草效果相关联,而在植物体内表现出较弱活性的原因是结合缓慢和竞争行为,后者尤为重要,例如

在一定时间内, 结合 $1 \mu\text{m}$ 的 IpOHA 而结合 $100 \mu\text{m}$ 的底物 $\text{AL}^{[30]}$, 因为对 KARI 的部分抑制作用将导致底物 AL 或 AHB 的迅速累积, 通过与抑制剂竞争, 阻止了更多的抑制作用。值得一提的是, Wittenbach 等人^[32]研究表明, IpOHA 在植物体内可穿透质体, 而 KARI 是存在于质体内的, 从而说明 KARI 在植物体内活性较弱的原因并不是来自于抑制剂在植物体内经过代谢降解而不能到达其靶标位点。

以上研究表明, 靶向 KARI 的有效除草剂必须是一个具有高结合速率常数的竞争性抑制剂, 或者是一个非竞争性抑制剂。

3.2 噻二唑类抑制剂

Halgand^[33]等通过高通量筛选, 在 96 孔微滴定板上共筛选了 1.0×10^4 个不同分子, 发现 1, 2, 3-噻二唑类衍生物是植物 KARI 的强烈非竞争性抑制剂, 如图 5 所示。



Compd. 1 $\text{R}^1 = \text{COOC}_2\text{H}_5$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^5 = \text{R}^6 = \text{H}$, $\text{R}^4 = \text{Cl}$, $n=2$.

Compd. 2 $\text{R}^1 = \text{COOC}_2\text{H}_5$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}$, $\text{R}^6 = \text{Cl}$, $n=1$.

Fig 5 Structure of thiadiazole derivatives discovered by high-throughput screening

通过稳态动力学测试研究了这两类化合物的抑制机理, 其中化合物 1 是一类不可逆非竞争性抑制剂, 化合物 2 则是可逆非竞争性的。虽然化合物 1 到达 KARI 靶标位点的速率要快于 IpOHA , 但其对酶活性的抑制也同样是时间依赖性的。研究噻二唑类衍生物的构效关系 (共分析了 140 个此类化合物) 发现, 影响 IC_{50} 值的因素有二: (1) 连接两环的桥上硫原子的氧化态, IC_{50} 值以 $\text{SO}_2 < \text{SO} < \text{S}$ 呈现增大的趋势; (2) 噻二唑环的亲电性。当 R_1 的亲电性增加时, IC_{50} 值迅速下降。其它因素如亲油性、分子的大小等不影响 IC_{50} 值。另外, 通过化合物 1 与植物 KARI 复合物的 ESI-MS 实验确定了半胱氨酸 498 (Cys498) 是抑制剂的结合位点。残基 Cys498 位于远离酶的活性位点—— N -端和 C -端区域的裂缝处, 证实了非竞争性抑制剂作用的不是活性位点处。

尽管化合物 1 和 2 在体外都有很强的除草活性, 但在植物体内都不是有效的抑制剂。

4 KARI 晶体结构及动力学研究

到目前为止, KARI 单个的晶体还没有得到, 但在 1994 年和 2000 年分别得到了酶- NADPH-Mg^{2+} -抑制剂 (IpOHA)^[34] 和 酶-[(phospho)-ADP-ribose]- Mn^{2+} -DMV (底物 AHB 的产物)^[24] 复合物的晶体。通过单晶 X 射线衍射测试发现二者的晶体结构整体上是相同的。晶体结构显示酶是由两个二聚体组成的, 即有四个单体, 每一个单体由两个连续的区域组成。 N -端区域 (残基 72-307) 有一个带有经典二核苷酸折叠 (Rossmann fold) 的混合 α/β 结构, 除了烟酰胺部分是在与其它区域的界面处之外, 包含了大部分 NADPH 的结合位点。 C -端区域 (残基 308-595) 组成了大部分桶式 α -螺旋结构, 这一区域有两个功能: (1) 促成金属离子与底物 (或者底物类似物, 抑制剂) 识别位点的形成; (2) 对单体-单体相互作用具有重要意义。酶活性位点位于每个单体两个区域的交界处, 包含了两个二价阳离子, 五个水分子, 一个抑制剂或反应产物以及 NADPH 的烟酰胺部分。

通过动力学实验证实了植物和细菌 KARI 与底物以及辅助因子结合符合一个顺次机理: NADPH 和 Mg^{2+} 首先与 KARI 独立地结合, 接着是底物结合^[16,19]。配体与酶的结合符合化学计量单位, 即为 1:1。配体结合的规则和化学计量学是由菠菜酶的电喷雾质谱实验证实^[35]的。酶与配体结合前后构象发生了变化, 是通过荧光试验^[19]以及 H/D 交换研究^[36]得到的结论。

5 总结

就目前为止, 所见文献报道 KARI 抑制剂仅限 Hoe 704、 IpOHA 以及噻二唑类衍生物几种, 这些抑制剂抑制能力均表现为时间依赖性, 在体外具有较高的除草活性, 而在体内的活性却很微弱, 其原因可能是酶和抑制剂结合缓慢或存在底物的竞争行为。正如 Schloss^[37]指出的, 从为农业或药物应用设计抑制剂的观点来看, 酶与抑制剂低的离解率是人们所希望的, 因为它有望于加强抑制剂的抑制效果; 而低的结合率是不希望的, 因为在植物体内给定浓度下它将延迟抑制作用所需的时间。对 KARI 来说, 后者尤为重要。值得庆幸的是目前已经得到了酶与抑制剂复合物的晶体结构, 这为基于靶标结构的药物设计 (structure-based drug design) 提供了可能和

方便。靶向 KAR I 的除草剂研究还只是初见端倪还有着广阔的研究空间。

参考文献:

- [1] Singh B K, Shaner D L. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 935-944
- [2] Garault P, Letort C, Juillard V, et al. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12): 5128-5133
- [3] LI Zhengming (李正名), JIA Guo-feng (贾国锋), WANG Ling-xiu (王玲秀), et al. 新磺酰脲类化合物的合成、结构及构效关系 (I)——N-(2'-噁啉基)-2-甲酸乙酯-苯基磺酰脲的晶体及分子结构[J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1992, 13(11): 1411-1414
- [4] Shaner D L, Anderson P C, Stidham M A. Imidazolinones: Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase [J]. *Plant Physiol*, 1984, 76: 545-546
- [5] Schulz A, Sponemann P, Kocher H, et al. The herbicidally active experimental compound Hoe 704 is a potent inhibitor of the enzyme acetolactate reductoisomerase [J]. *FEBS LETTERS*, 1988, 238(2): 375-378
- [6] Dumas R, Joyard J, Douce R. Purification and characterization of acetohydroxyacid reductoisomerase from spinach chloroplasts [J]. *Biochem J*, 1989, 262: 971-976
- [7] Durner J, Knorz O, Boger P. Keto- acid reductoisomerase from barley (*Hordeum Vulgare*) [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103: 903-910
- [8] Wek R C, Hatfield G W. Nucleotide sequence and *in vivo* expression of the *ilvY* and *ilvC* genes in *Escherichia coli* K12. Transcription from divergent overlapping promoters [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261: 2441-2450
- [9] Wek R C, Hatfield G W. Transcriptional activation at adjacent operators in the divergent-overlapping *ilvY* and *ilvC* promoters of *Escherichia coli* [J]. *J Mol Biol*, 1988, 203: 643-663
- [10] Petersen J G L, Holmberg S. The *ilv5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed [J]. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14: 9631-9651
- [11] Dumas R, Lebrun M, Douce R. Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding acetohydroxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts [J]. *Biochem J*, 1991, 277: 469-475
- [12] Dumas R, Curien G, Derose R T, et al. Branched-chain-amino-acid biosynthesis in plants: molecular cloning and characterization of the gene encoding acetohydroxy acid isomerase (keto-l-acid reductoisomerase) from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochem J*, 1993, 294: 821-828
- [13] Curien G, Dumas R, Douce R. Nucleotide sequence and characterization of a cDNA encoding the acetohydroxy acid isomerase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 717-722
- [14] Akhmanova A, Voncken F G, Harhangi H, et al. Cytosolic enzymes with a mitochondrial ancestry from the anaerobic chytrid *Piramyces* Sp. E2 [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30: 1017-1027.
- [15] Zelenaya-Troitskaya O, Perlman P S, Butow R A. An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability [J]. *EMBO J*, 1995, 14: 3268-3276
- [16] Chunduru S K, M rachko G T, Calvo K C. Mechanism of keto- acid reductoisomerase——steady-state analysis and metal ion requirement [J]. *Biochemistry*, 1989, 28: 486-493
- [17] Dumas R, Butikofer M C, Job D, et al. Evidence for two catalytically different magnesium-binding sites in acetohydroxy acid isomerase by site-directed mutagenesis [J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 6026-6036
- [18] Armstrong F B, Hedgecock C J R, Reary J B, et al. Stereochemistry of the reductoisomerase and α , β -dihydroxyacid dehydratase-catalysed steps in valine and isoleucine biosynthesis. Observation of a novel tertiary keto rearrangement [J]. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1974: 351-352
- [19] Dumas R, Job D, Ortholand J Y, et al. Isolation and kinetic properties of acetohydroxy acid isomerase from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts overexpressed in *Escherichia coli* [J]. *Biochem J*, 1992, 288: 865-874
- [20] Arfin S M, Umbarger H E. Purification and properties of the acetohydroxy acid isomerase of *Salmonella typhimurium* [J]. *J Biol Chem*, 1969, 244: 1118-1127.
- [21] Umbarger H E. Evidence for a negative feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine [J]. *Science*, 1956, 123: 848
- [22] Biau V, Pebay-Peyroula E, Cohen-Addad C, et al. Biosynthesis of branched-chain amino acids in plants: structure and function of acetohydroxy acid isomerase

- ductase [A] Mathis P. Photosynthesis: from light to biosphere [M] Kluwer: Dordrecht, 1995, V: 335-340
- [23] Rane M J, Calvo K C. Reversal of the nucleotide specificity of ketol acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis identifies the NADPH binding site [J] *Arch Biochem Biophys*, 1997, 338: 83-89
- [24] Thomazeau K, Dumas R, Halgand F, *et al* Structure of spinach acetohydroxyacid isomerase reductase complexed with its reaction product dihydroxymethylvalerate, manganese and (phospho)-ADP-ribose [J] *Acta Crystallogr D*, 2000, 56: 389-397.
- [25] Bïou V, Dumas R, Cohen-Addad C, *et al* The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomerase reductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65 Å resolution [J] *EMBO J*, 1997, 16: 3405-3415
- [26] Proust-DeMartin F, Dumas R, Field M J. A hybrid-potential free-energy study of the isomerization step of the acetohydroxy acid isomerase reductase reaction [J] *J Am Chem Soc*, 2000, 122(32): 7688-7697.
- [27] Shematek E M, Diven W F, Arfin S M. Subunit structure of α -acetohydroxy acid isomerase reductase from *Salmonella typhimurium* [J] *Arch Biochem Biophys*, 1973, 158: 126-131
- [28] Aulabaugh A, Schloss J V. Oxalyl hydroxamates as reaction-intermediate analogues for ketol-acid reductoisomerase [J] *Biochemistry*, 1990, 29(11): 2824-2830
- [29] Bauer K R, Bieringer H E, BÛrstell H F, *et al* Phosphorus-containing functional derivatives of acetic acid, process for their preparation and herbicidal and growth-regulating agents containing them [P] European Patent: EP 0106114, 1986-06-10
- [30] Dumas R, Cornillon-Bertrand C, Guigue-Talet P, *et al* Interactions of plant acetohydroxy acid isomerase reductase with reaction intermediate analogues: correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects [J] *Biochem J*, 1994, 301: 813-820
- [31] Grandoni J A, Marta P T, Schloss J V. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents [J] *J Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 42: 475-482
- [32] Wittenbach V A, Anlabaugh A, Schloss J V. In proceedings of the seventh international congress of pesticide chemistry (IUPAC) [C] Weinheim VCH publishers, and New York: 1990 151-160
- [33] Halgand F, Vives F, Dumas R, *et al* Kinetic and mass spectrometric analysis of the interactions between plant acetohydroxy acid isomerase reductase and thiazazole derivatives [J] *Biochemistry*, 1998, 37(14): 4773-4781
- [34] Dumas R, Job D, Douce R, *et al* Crystallization and preliminary crystallographic data for acetohydroxy acid isomerase reductase from *Spinacia oleracea* [J] *J Mol Biol*, 1994, 242: 578-581
- [35] Laprevote O, Serani L, Das B C, *et al* Stepwise building of a 115-kDa macromolecular edifice monitored by electrospray mass spectrometry. The case of acetohydroxy acid isomerase reductase [J] *Eur J Biochem*, 1999, 256: 356-359
- [36] Halgand F, Dumas R, Bïou V, *et al* Characterization of the conformational changes of acetohydroxy acid isomerase reductase induced by the binding of Mg^{2+} ions, NADPH, and a competitive inhibitor [J] *Biochemistry*, 1999, 38: 6025-6034
- [37] Schloss J V. Significance of slow-binding enzyme inhibition and its relationship to reaction-intermediate analogs [J] *Acc Chem Res*, 1988, 21(9): 348-353