

· 专论与综述 ·

乙酰乳酸合成酶及其抑制剂研究新进展

王建国*

(天津化学化工协同创新中心/元素有机化学国家重点实验室/南开大学 元素有机化学研究所, 天津 300071)

摘要:乙酰乳酸合成酶(AHAS)是支链氨基酸生物合成途径中的一个关键酶,是绿色除草剂的重要作用靶标。由于此生物合成过程只存在于植物和微生物体内,因此该类抑制剂对哺乳动物具有生物安全性。近年来,随着AHAS三维结构的阐明,人们不仅深入了解了已有抑制剂的作用机制,并且依此设计开发了一些新型的抑制剂,拓展了其在抑菌活性方面的生物学功能。文章对近年来AHAS及其抑制剂的最新研究进展进行了综述,重点就AHAS的酶学特征、结构特征及结合方式,以AHAS为靶标的新颖除草活性化合物的设计开发以及AHAS抑制剂的抗菌生物活性研究进展等问题详细进行了总结,以期为设计开发靶向AHAS的新型除草剂或抗菌药物提供参考。

关键词:乙酰乳酸合成酶;绿色除草剂;分子设计;作用机制

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2014.04.01

中图分类号:S482.4 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2014)04-0367-08

Recent progress on acetohydroxyacid synthase and its inhibitors

WANG Jianguo*

(Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), State Key Laboratory and Research Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Acetohydroxyacid synthase (AHAS) is a key enzyme involved in the biosynthesis pathway of branched-chain amino acids, and it is an important target for green herbicides. This enzyme only exists in plants and microbes, therefore its inhibitors are biologically safe to mammals. With the recent elucidation of three dimensional AHAS structures, detailed understanding on the inhibition mechanism of current inhibitors has been achieved, and novel AHAS inhibitors have been designed and discovered. Moreover, AHAS inhibitors have been investigated their new biological function as antimicrobial agents. This review summarizes the progress on AHAS and its inhibitors within recent years, in order to provide useful information for the development of novel herbicides or antibiotics targeting AHAS.

Key words: acetohydroxyacid synthase (AHAS); green herbicides; molecular design; inhibition mechanism

缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等支链氨基酸的生物合成只能在植物和微生物体内进行,而乙酰乳酸

合成酶(简称AHAS或ALS, EC 2.2.1.6)是该生化过程中的第一个酶,靶向此生物途径的抑制剂对哺

收稿日期:2014-04-05;修回日期:2014-06-26.

作者简介:*王建国,通信作者(Author for correspondence),男,博士,副研究员,主要从事新农药创制基础理论研究, E-mail:nkwjg@nankai.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(21272128,81271777);国家重大基础研究计划(973计划)项目(2010CB126103).

乳动物具有生物安全性。自 1984 年 Schloss 和 Shaner 等^[1-2] 分别发现磺酰脲和咪唑啉酮等绿色除草剂的作用靶标是 AHAS 以来,与之相关的研究就

一直是世界农药研究领域关注的热点。常见的以 AHAS 为靶标的商品化除草剂还有嘧啶氧苯甲酸和三唑嘧啶磺酰胺等类型(图 1)。

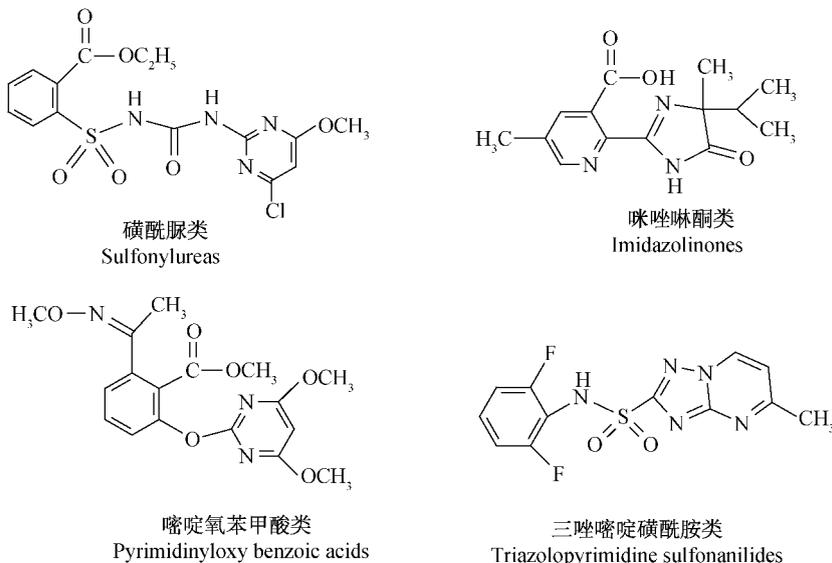


图 1 典型的商品化 AHAS 抑制剂类型

Fig. 1 Typical families of commercial AHAS inhibitors

2002 年,澳大利亚的 Duggleby 小组首次获得并解析了来自酵母的 AHAS 晶体结构,这是该领域研究在结构生物学方面的新起点^[3]。有关 AHAS 及其抑制剂的早期研究,Shaner 和 Duggleby 等曾分别于 1997、2000 和 2006 年做过详细的综述,对 AHAS 的酶学特征、抑制剂类型、复合物晶体三维结构以及由氨基酸残基突变引起的杂草抗性等方面的进展进行了详细深入的介绍^[4-6]。为了进一步了解有关 AHAS 及其抑制剂的最新研究进展,笔者拟针对国内外近年来在该领域开展的结构生物学研究、

靶向 AHAS 新类型抑制剂设计发现、AHAS 抑制剂的新生物学功能等相关研究进展进行全面综述。

1 AHAS 酶学特征、结构特征及结合方式

1958 年 Umbarger 等发现,在支链氨基酸生物合成中有一个催化乙酰乳酸生物合成的酶,即乙酰乳酸合成酶(AHAS)^[7]。该酶可催化 2 分子的丙酮酸生成乙酰乳酸,或催化 1 分子的丙酮酸与 1 分子的 2-酮丁酸生成 2-乙酰基-2-羟基丁酸,再经过之后的多步生化反应得到支链氨基酸(图 2)。

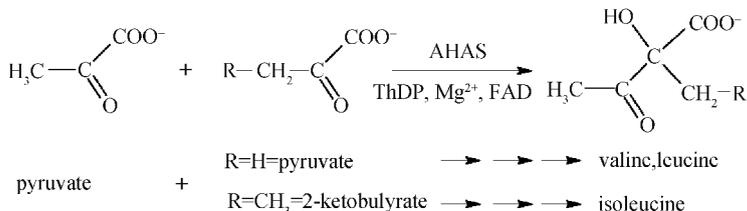


图 2 乙酰乳酸合成酶催化的生物化学反应

Fig. 2 The biochemical reaction catalyzed by acetohydroxyacid synthase

AHAS 在植物、细菌、真菌以及藻类等体内均已相继被发现^[5]。该酶一般由调控亚基和催化亚基共同构成,催化亚基的分子质量约为 60 ku,调控亚基的分子质量约为 10 ~ 17 ku,对于实现 AHAS 的全酶活性,这 2 个亚基的作用是必不可少的^[5]。在真菌和植物中一般只有 1 种 AHAS 同工酶,而在细

菌中则存在着不同的 AHAS 同工酶。由于支链氨基酸的简写分别为 I、L、V,所以一般情况下表达某种细菌或真菌中 AHAS 的基因可表示为 *ilvx*,如酵母菌 AHAS 催化亚基基因为 *ilv2*,大肠杆菌 AHAS 基因为 *ilvBN*、*ilvGM* 和 *ilvIH* 等,这种命名方式也适用于支链氨基酸生物合成途经的其他酶^[5-6]。若要

维持 AHAS 的活性,需要 3 个必不可少的辅助因子——焦磷酸硫胺素(ThDP)、1 个二价金属离子和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)^[8]。研究表明:ThDP 直接参与 AHAS 催化的生化反应,形成 1 个与 AHAS 结合的反应中间体羧乙基-ThDP;与其他依赖 ThDP 的酶类似,AHAS 也需要 1 个金属离子诸如 Mg^{2+} 的辅助^[9];而 FAD 对 AHAS 活性所起的具体作用尚不清楚,因为该辅助因子并不直接参与 AHAS 催化的生化反应。

自从 AHAS 被发现是磺酰脲等超高效除草剂的作用靶标后,关于其空间结构的研究就引起了人们的极大兴趣,因为这将有助于了解 AHAS 抑制剂的分子基础并设计合成新的活性化合物,但是科学家们几经努力均未成功。直到进入本世纪,相关研究才真正取得了突破性进展,其核心是 Duggleby 等相继获得并解析了酵母 AHAS 催化亚基纯酶的晶体结构,以及酵母 AHAS 催化亚基与不同磺酰脲除草剂的复合物结构^[3,10-11]。研究表明,酵母 AHAS 由 2 个相同的催化亚基构成,抑制剂则结合在由这 2 个催化亚基界面组成的口袋上。对于酵母 AHAS 纯酶,由于没有抑制剂与之结合,其结合空腔部分的氨基酸残基处于 loop 区,因而导致这一部分的空间结构无法被准确解析;而在酵母 AHAS 与磺酰脲的复合物晶体中,这一部分氨基酸残基较为清晰——由于抑制剂的存在将 2 个界面紧紧地结合在了一起。2006 年,Duggleby 小组又解析了拟南芥 AHAS 的催化亚基分别与磺酰脲和咪唑啉酮类除草剂的复合物晶体结构,进一步增强了对这类除草剂作用机制的了解^[12]。拟南芥 AHAS 催化亚基与小分子除草剂的复合物晶体是一个四聚体(图 3),与酵母 AHAS 与磺酰脲类除草剂的复合物晶体相比,当用氨基酸主链上的 525 个碳原子进行叠合时,只有 0.1 nm 的均方根偏差。拟南芥 AHAS 每个催化亚基均由 α 区域(残基 86~280)、 β 区域(残基 281~451)、 γ 区域(残基 463~639)以及碳端催化活性部位的柔性 loop 区域(残基 646~668)组成。在相同条件下无法获得拟南芥 AHAS 催化亚基纯酶的晶体结构,说明其与除草剂分子的结合对于加强 2 个亚基之间界面的相互作用至关重要^[12]。对于细菌来源的 AHAS,苏晓东与席真教授^[13]合作,于 2011 年获得了来自大肠杆菌 AHAS II 催化亚基纯酶的晶体,不过该晶体的三维结构尚未报道。相对来说,目前关于 AHAS 催化亚基晶体结构的研究已较为深入,而对于其调控亚基,则只有以色列的 Shaanan

研究组在 2006 年解析了大肠杆菌 AHAS III 的调控亚基晶体结构^[14],指出该晶体结构是一个二聚体,这为深入研究缬氨酸等小分子对 AHAS 的反馈抑制提供了可参考的信息。由于由调控亚基和催化亚基共同组成的 AHAS 全酶催化活性更高,且有利于全面研究小分子抑制剂的作用机制,因此研究 AHAS 全酶的晶体结构将是科学家们下一阶段需努力攻克的目标。

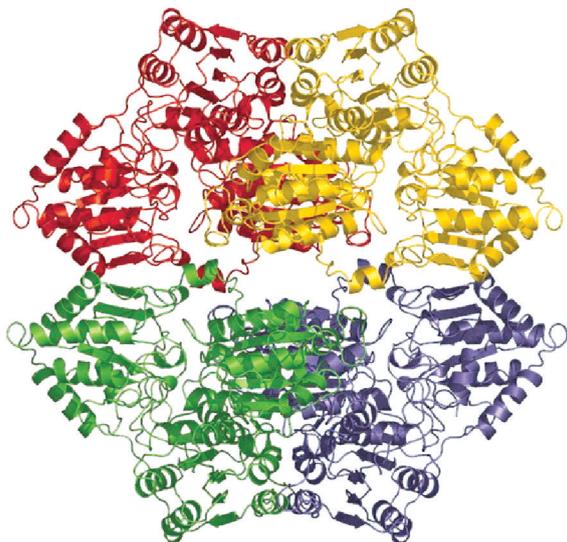


图 3 拟南芥 AHAS 复合物晶体的四聚体结构^[12]

Fig. 3 The tetrameric structure of *Arabidopsis thaliana* AHAS^[12]

在 AHAS 与抑制剂形成的复合物晶体结构被解析之前,有关磺酰脲等超高效除草剂的具体作用机制并不十分清楚。早期人们发现,某些氨基酸残基突变能引起 AHAS 对不同抑制剂产生抗性,其中最常见易发生突变的氨基酸残基是 A122、P197、W574 和 S653(相对于拟南芥 AHAS 的编号),由于这些突变体对磺酰脲和咪唑啉酮类除草剂的抗性表现并不相同,说明这些抑制剂与 AHAS 的结合部位可能存在一定的交叉^[5]。由此推测这些氨基酸残基可能构成了除草剂的结合位点。Chipman 和 Kakefuda 等分别据此同源蛋白模型构建了细菌和植物中 AHAS 的三维结构,并模拟了其与除草剂的结合模式^[15-16]。Duggleby 等通过系统研究酵母 AHAS 的突变体,并同酵母 AHAS 与氯嘧磺隆的复合物结构进行对比,发现 13 个突变体的突变氨基酸残基均处于除草剂的结合空腔中^[10,17]。

在拟南芥 AHAS 催化亚基与除草剂的复合物被进一步报道后,通过对比发现,磺酰脲除草剂与植物 AHAS 的结合模式和其与酵母 AHAS 的结合模

式十分类似,都是位于催化反应位点的通道口,通过进一步阻止酶催化反应而达到抑制效果^[12]。磺酰脲分子在复合物中呈伸展构象,这与其在小分子晶体结构中存在分子内氢键的构象明显不同^[18],显然,小分子抑制剂与 AHAS 的结合构象才是在三维定量构效关系研究中应被使用的活性构象。根据复合物晶体中磺酰脲分子的构象,王建国和李正名等^[19]对系列单取代磺酰脲类除草剂进行了比较分子力场分析研究,席真和杨光富等^[20]为磺酰脲类除草剂分子定义了一种新的量子化学描述符。Jaña 等^[21]则发现,在磺酰脲类除草剂与 AHAS 形成的复合物中,其活性构象与活化吉布斯自由能和吉布斯自由能的变化有关,并可影响磺酰脲类除草剂的活性。

对于咪唑啉酮类除草剂,目前只得到了灭草唑与拟南芥 AHAS 复合物的晶体,该除草剂也结合在拟南芥 AHAS 催化位点的活性空腔里。磺酰脲类除草剂与拟南芥 AHAS 催化亚基之间存在至少 50 个范德华相互作用和 6 个氢键相互作用,而灭草唑与拟南芥 AHAS 间只存在 28 个范德华相互作用和 1 个氢键相互作用,这也就解释了磺酰脲类除草剂在离体条件下对 AHAS 的抑制活性普遍显著高于咪唑啉酮类除草剂的原因^[12]。关于其他类型的 AHAS 抑制剂,目前尚未见任何关于其与 AHAS 形成的复合物晶体结构的报道。需要着重指出的是,南开大学李正名课题组不仅创制了我国首个具有自主知识产权的除草剂单啞磺隆,还在 2009 年报道了该类除草剂与拟南芥 AHAS 的复合物结构(图 4)。从中发现了杂环单取代磺酰脲类除草剂与靶酶的结合模式基本上与双取代商品化磺酰脲品种类似,除明确了杂环单取代基的朝向外,还首次发现在该复合物中辅酶 ThDP 的结构是完整的^[22]。通过进一步研究发现,当拟南芥 AHAS 与磺酰脲分子的杂环部分相互作用时,存在大小 2 个结合空腔,当其于双取代磺酰脲类作用时,2 个结合空腔都与药剂相互作用,而当其与单啞磺隆等作用时,则只与较小的结合空腔发生相互作用,从而解释了该类除草剂对 AHAS 的抑制活性及其所具有的生物选择性的原因^[23]。目前单啞磺隆已完成产业化,成为了在我国北方农田推广使用的商品化除草剂。

2 以 AHAS 为靶标的新颖除草活性化合物的设计开发

由于靶向 AHAS 的除草剂所具有的优良特性,

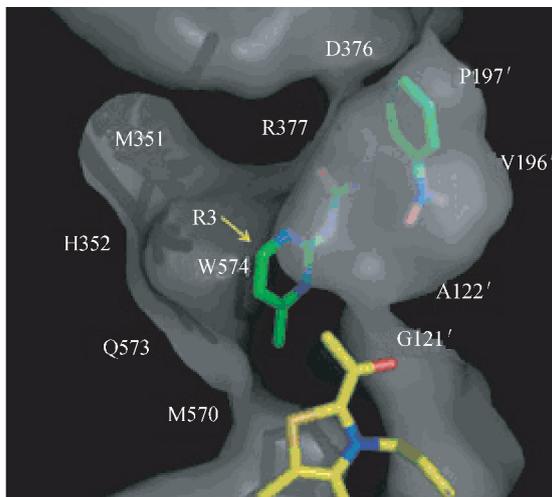


图 4 单啞磺隆与 AtAHAS 的复合物结构^[22]

Fig. 4 Crystal structure of monosulfuron in complex with *Arabidopsis thaliana* AHAS^[22]

新类型抑制剂的设计和研发一直受到广泛关注,但目前尚未开发出全新类型的商品化 AHAS 抑制剂。在新结构的先导化合物研究方面,杨光富、王建国等分别开展了较系统的研究工作。杨光富等主要是针对商品化抑制剂的结合模式,拟通过较为精细的分子设计达到活性提高或反抗性的目的;王建国等则通过虚拟筛选发现全新类型的 AHAS 抑制剂,并进行结构-活性关系研究。

2006 年,杨光富等^[24]基于环酯草醚类型的结构,设计了一类甲基取代的二氮杂萘酮嘧啶醚类化合物,经过生物活性测试发现,部分化合物对于野生型拟南芥 AHAS 的抑制常数接近商品化药剂 KIH-6127,个别化合物茎叶处理时在 150 g/hm² 剂量下表现出较好的除草活性,表明这是一类具有新结构的 AHAS 抑制剂。这也是我国农药创制研究中较早采用离体 AHAS 抑制作为测试手段的一个实例。之后,杨光富和席真等^[25]通过分子对接、CoMFA 和密度泛函等计算化学手段,细致地研究了嘧啶氧苯甲酸类除草剂的活性构象,就理论上可能存在的 2 种构象(构象-L 和构象-R)分别进行了研究,通过比较 CoMFA 和 CoMSIA 模型的结果,发现构象-R 更有可能是该类靶向 AHAS 除草剂的活性构象。进一步通过分子对接研究表明,该类除草剂和磺酰脲类除草剂在结合方式上存在一定的相似处,但这 2 类除草剂的苯环在与 Pro192 相互作用时其取向正好相反,这在一定程度上解释了当 AHAS 中的 Pro192 发生突变时,这 2 类除草剂对突变体表现出敏感性不同的原因。基于此,他们设计得到了生物

活性测试值和预测值较吻合的新化合物。

对于突变型 AHAS 表现出的抗性问题,杨光富和席真等基于构象柔性的原理和思路,结合动力学模拟和分子对接方法进一步进行了分子设计^[26]。他们分析发现,连接磺酰脲和三唑啉磺酰分子 2 个芳环的桥键部分过长,当 W586L 突变发生后,原本与色氨酸存在 π - π 相互作用的杂环(或芳环)部分的构象不能发生有效变化,因此产生了较强的抗性;而对于双草醚,由于其芳环是由氧原子相连,分子能够进行构象的有效调整,因而当 W586L 突变发生后,对其产生的抗性较弱。基于该理念,他们将三唑啉磺酰胺分子中的磺酰胺部分用氧原子替代,再进一步对结合口袋中产生的氢键进行设置,并且采用 $\Delta(\Delta G)$ 的概念来描述抑制剂对于野生型和

W586L 突变型 AHAS 活性的差异,最终设计得到了对 W586L 突变型与野生型的抑制活性在同一水平的化合物(图 5A)。

杨光富等^[27]从啉啉磺草胺(FS)的结构出发,设计合成了新型除草剂 Y6610(图 5B),该化合物比啉啉磺草胺对 AHAS 的抑制活性低一个数量级,但是在盆栽试验采用茎叶处理时,二者活性相当。在土壤中的半衰期研究表明,Y6610 比啉啉磺草胺的半衰期短 3.9 d,表明其可以作为一个候选化合物进行进一步研究。基于此,他们又设计合成了一批新化合物,其中部分化合物的离体 AHAS 抑制活性接近啉啉磺草胺,通过分析新化合物与 Y6610 在结合口袋中形成氢键的变化,解释了新化合物活性提高的原因^[28]。

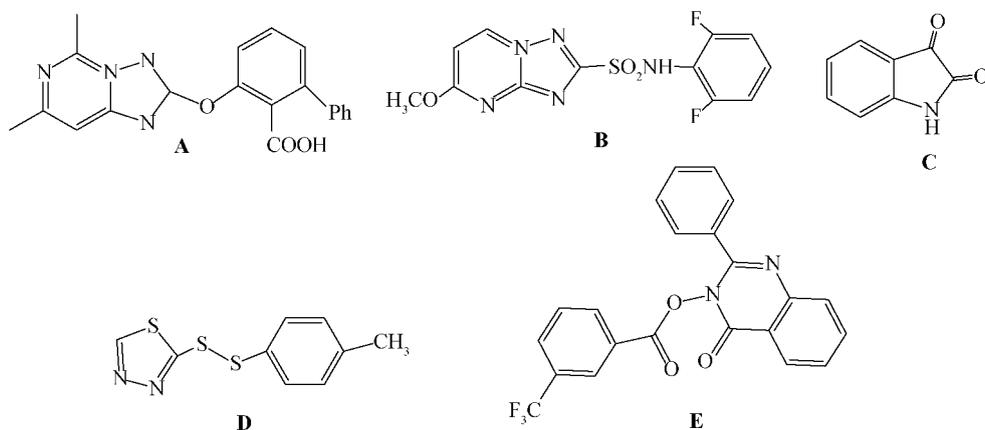


图 5 近年来设计发现的新结构 AHAS 抑制剂

Fig. 5 Novel AHAS inhibitors that were designed and identified recently

2007 年,王建国和李正名等^[29]从另一个角度出发,基于酵母 AHAS 和拟南芥 AHAS 晶体结构的结合位点,采用分子对接方法对 ACD-3D 有机分子数据库进行了虚拟筛选。结合能量打分和疏水性常数等因素,从由 2 种模型筛选得到的具有分子结构交集的近 300 个化合物结构库中,购买 14 个化合物进行了活性验证。结果表明,有 3 个化合物对拟南芥 AHAS 的抑制常数 (K_i) 分别达到了 15.2、42.1 和 90.7 $\mu\text{mol/L}$,其中 1 个化合物用平皿法测定时还表现出了一定的除草活性。这是农药研究领域首次基于靶酶结构进行虚拟筛选并发现新结构先导化合物的成功实例。

基于虚拟筛选发现的结构信息,王建国等于 2011 年设计合成了一类吡啶满二酮衍生物^[30]。生物活性测定结果表明,许多吡啶满二酮衍生物对拟南芥 AHAS 均表现出了较好的抑制活性,其中部分化合物用平皿法测定时对油菜根生长表现出了较

好的抑制活性(图 5C)。通过构建 CoMFA 模型、密度泛函方法计算前线轨道,以及分子对接分析化合物的结合模式,发现吡啶满二酮母核结构对于保持对 AHAS 的抑制活性具有重要作用。尽管此类化合物的生物活性并不是很高,但作为首次发现的一类全新类型 AHAS 抑制剂,其对进一步发现新的先导化合物提供了重要参考。

近来,王建国等基于通过虚拟筛选发现的另一类先导化合物,再次设计发现了不对称芳香二硫醚类 AHAS 抑制剂^[31]。研究表明,不对称芳香二硫醚类化合物对拟南芥 AHAS 的抑制常数可达 1.7 $\mu\text{mol/L}$,与商品化咪唑啉酮类除草剂的离体生物活性相当。更重要的是,该类化合物对于代表性的拟南芥 AHAS 突变型 W574L 只表现出了 5 ~ 10 倍的抗性,而目前 W574L 对磺酰脲和咪唑啉酮等商品化 AHAS 抑制剂的抗性都在 100 ~ 3 000 倍之间^[32]。许多不对称芳香二硫醚类化合物通过平

皿法测定均表现出了很高的除草活性。通过进一步结构衍生化,用1,2,4-噻二唑取代1,3,4-三唑后,所合成的新化合物表现出了很好的盆栽除草效果,其中代表性化合物在1 500 g/hm²剂量下茎叶处理后对双子叶杂草的抑制率可达80%~100%(图5D)^[33]。通过外源支链氨基酸试验,进一步表明由于AHAS被抑制而使得不对称芳香二硫醚类具有了除草活性。尽管不对称芳香二硫醚的盆栽除草效果与商品化AHAS抑制剂还有差距,但作为新的先导化合物仍非常值得开展后续研究,这是目前靶向AHAS进行全新结构的除草剂分子设计所取得的较有意义的进展。

3 AHAS抑制剂的抗菌生物活性研究进展

支链氨基酸的生物合成途径在微生物体内也存在,因此,AHAS实际上也可以作为抗菌药物的靶点。1998年,Grandoni等^[34]提出支链氨基酸生物合成抑制剂可用于发展抗结核药物研究,并发现磺酰脲类除草剂甲噁磺隆在500 mg/(kg·d)剂量下可明显减轻小鼠肺结核症状,在动物模型层面证明了其具有抗结核活性。此后,人们在这一方面陆续也做过一些研究,但尚未研发出可用于临床的AHAS抑制剂药物,因此该领域的研究一直未得到足够重视。由于微生物与植物差别很大,比如杂草等植物属于宏观孤立的个体,只要其支链氨基酸的生物合成被抑制,杂草就会死亡;但是微生物往往依赖于周围的环境,即使抑制了其体内的AHAS,微生物仍有可能从周围环境中获取外源支链氨基酸而得以生存。因此,AHAS是否可以作为某种细菌或真菌的靶标,通常还需要先经过基因敲除的方法来研究当AHAS被抑制后微生物是否还能正常存活,并据此判断AHAS是否可作为其潜在的抑菌靶标^[35]。Yoon和Guddat等分别在2012年和2014年就这一方面的详细进展进行过总结,主要从细菌或真菌的AHAS序列同源性、酶动力学特征、绿色除草剂对微生物AHAS的抑制活性等方面进行了综述^[35-36]。本文拟就近年来在医学重要致病菌结核分枝杆菌和白色念珠菌AHAS方面取得的主要进展进行介绍。

Yoon等在2005年首次表达纯化了结核分枝杆菌AHAS的催化亚基(TB-AHAS),系统测定了典型磺酰脲类除草剂和咪唑啉酮类除草剂对TB-AHAS的抑制效果,发现磺酰脲类对TB-AHAS的*K_i*值与其对植物AHAS的*K_i*值相比高了很多,而咪唑啉酮类除草剂则几乎不能抑制TB-AHAS^[37]。

2009年,Sharma等通过基因敲除方法去掉了结核分枝杆菌TB-AHAS的*ilvB1*基因,发现该菌株仍然能够在小鼠体内生存,但无致病性^[38]。2011年,Srivastava等进一步研究发现,当*ilvB1*基因被敲除后,另外2种基因*ilvG*和*ilvB2*所表达的AHAS还能发挥重要的功能,从而使结核分枝杆菌能够继续生存,这一点在进行药物设计时需要考虑^[39]。2012年,王迪和李正名等设计合成了一类杂环单取代的磺酰脲类化合物,并进行了活性验证,其中部分化合物对结核分枝杆菌标准株和耐药株的最小抑制浓度(MIC)可达10 mg/L^[40-41]。王建国和朱维良等则通过同源蛋白模型构建了TB-AHAS的三维结构,采用分子对接的方法进行虚拟筛选,发现了1个苗头化合物,在此基础上通过结构相似性进一步搜寻,最终发现了全新结构的高活性微生物AHAS抑制剂类化合物,其对结核分枝杆菌的MIC值为2.5 mg/L(图5E),该化合物不仅对各种临床分离得到的耐药株具有很好的抑制活性,而且在巨噬细胞THP-1体内也具有很好的抑制炎症的活性^[42],因此可以作为新的先导化合物进一步研究。

McCusker等于2004年发现,当隐球菌的AHAS基因*ilv2*被突变后,采用其感染小鼠,该菌株无致病性,且很快死亡,说明AHAS可以作为隐球菌的药物靶标^[43]。该小组又于2010年针对白色念珠菌进行了类似研究,将其表达AHAS的*ilv2*基因敲除后,发现该菌在感染小鼠后即很快死亡,深入研究发现,真菌死亡源于其支链氨基酸的缺乏^[44]。这些研究表明,AHAS可以作为致病真菌的抑制剂靶标。根据此理论,Guddat和王建国等于2013年表达纯化了白色念珠菌AHAS的催化亚基,通过对一批商品化磺酰脲类除草剂的活性进行测定,发现氯噁磺隆不仅对真菌AHAS抑制活性很好,而且其对白色念珠菌的MIC值可达2 μmol/L,他们进一步设计了氯噁磺隆的一系列类似物进行研究,从中发现1个化合物对白色念珠菌的MIC值降低至0.6 μmol/L,已经超过了目前常用临床对照药剂氟康唑的药效,由此首次用正结果证明了AHAS可以作为抗真菌药物的理想靶标^[45]。

4 展望

本文主要对近十余年来乙酰乳酸合成酶(AHAS)及其抑制剂的研究进展进行了综述。由于在结构生物学方面取得的重大进展,人们对靶向AHAS除草剂的作用机制有了进一步的了解,对于

AHAS 及其抑制剂的研究也更加深入,但同时也应该认识到,杂草对于现有不同类型的 AHAS 抑制剂表现出了越来越突出的抗性,因此如何设计研发全新类型的靶向 AHAS 除草剂以应对杂草的抗药性,是一个重要的、亟待解决的科学问题。目前,尽管人们在分子设计方面取得了一定进展,但是还没有靶向 AHAS 的全新类型的除草剂问世;同时,AHAS 作为抗菌药物的靶标值得更深入研究,目前其在抗结核和抗白色念珠菌方面的研究进展,表明该领域研究应引起更广泛的关注和重视;另外,我国自主创制的磺酰脲类除草剂单嘧磺隆已推向市场,单嘧磺隆与 AHAS 复合物的晶体结构也已阐明,表明我国在这一领域的研究具有一定的优势。

参考文献 (Reference) :

- [1] LAROSSA R A, SCHLOSS J V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium* [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259(14): 8753–8757.
- [2] SHANER D L, ANDERSON P C, STIDHAM M A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase [J]. *Plant Physiol*, 1984, 76(2): 545–546.
- [3] PANG S S, DUGGLEBY R G, GUDDAT L W. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors [J]. *J Mol Biol*, 2002, 317(2): 249–262.
- [4] SHANER D L, SINGH B K. Acetohydroxyacid synthase inhibitors [M]// ROE M, BURTON J D, KUHR R J. Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology. Amsterdam: IOS Press, 1997: 69–110.
- [5] DUGGLEBY R G, PANG S S. Acetohydroxyacid synthase [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2000, 33(1): 1–36.
- [6] MCCOURT J A, DUGGLEBY R G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids [J]. *Amino Acids*, 2006, 31(2): 173–210.
- [7] UMBARGER H E, BROWN B. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate [J]. *J Biol Chem*, 1958, 233(5): 1156–1160.
- [8] CHIPMAN D, BARAK Z, SCHLOSS J V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1385(2): 401–419.
- [9] DUGGLEBY R G. Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes [J]. *Acc Chem Res*, 2006, 39(8): 550–557.
- [10] PANG S S, GUDDAT L W, DUGGLEBY R G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 7639–7644.
- [11] MCCOURT J A, PANG S S, GUDDAT L W, *et al.* Elucidating the specificity of sulfonylurea herbicide binding to acetohydroxyacid synthase [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(7): 2330–2338.
- [12] MCCOURT J A, PANG S S, KING-SCOTT J, *et al.* Herbicide binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(3): 569–573.
- [13] NIU Xuhui, LIU Xiang, ZHOU Yanfei, *et al.* Preliminary X-ray crystallographic studies of the catalytic subunit of *Escherichia coli* AHAS II with its cofactors [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011, 67(6): 659–661.
- [14] KAPLUN A, VYAZMENSKY M, ZHERDEV Y, *et al.* Structure of the regulatory subunit of acetohydroxyacid synthase isozyme III from *Escherichia coli* [J]. *J Mol Biol*, 2006, 357(3): 951–963.
- [15] IBDAH M, BAR-ILAN A, LIVNAH O, *et al.* Homology modeling of the structure of bacterial acetohydroxy acid synthase and examination of the active site by site-directed mutagenesis [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(50): 16282–16291.
- [16] OTT K H, KWAGH J G, STOCKTON G W, *et al.* Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase [J]. *J Mol Biol*, 1996, 263(2): 359–368.
- [17] DUGGLEBY R G, PANG S S, YU H, *et al.* Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase: Interpretation of herbicide-resistance data [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(13): 2895–2904.
- [18] 李正名, 赖城明. 新磺酰脲类除草活性构效关系的研究 [J]. *有机化学*, 2001, 21(11): 810–815.
LI Zhengming, LAI Chengming. Research on the structure/activity relationship of herbicidal sulfonylureas [J]. *Chin J Org Chem*, 2001, 21(11): 810–815. (in Chinese).
- [19] WANG Jianguo, LI Zhengming, MA Ning, *et al.* Structure-activity relationships for a new family of sulfonylurea herbicides [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2005, 19(11): 801–820.
- [20] XI Zhen, YU Zhihong, NIU Congwei, *et al.* Development of a general quantum-chemical descriptor for steric effects: density functional theory based QSAR study of herbicidal sulfonylurea analogues [J]. *J Comput Chem*, 2006, 27(13): 1571–1576.
- [21] JAÑA G A, DELGADO E J, MEDINA F E. How important is the synclinal conformation of sulfonylureas to explain the inhibition of AHAS: a theoretical study [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54(3): 926–932.
- [22] WANG Jianguo, LEE P M, DONG Yuhui, *et al.* Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase [J]. *Febs J*, 2009, 276(5): 1282–1290.
- [23] LI Zhengming, MA Yi, GUDDAT L, *et al.* The structure-activity relationship in herbicidal monosubstituted sulfonylureas [J]. *Pest Manag Sci*, 2012, 68(4): 618–628.
- [24] LI Yuanxiang, LUO Yanping, XI Zhen, *et al.* Design and

- syntheses of novel phthalazin-1 (2H)-one derivatives as acetohydroxyacid synthase inhibitors[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(24): 9135–9139.
- [25] HE Yanzhen, LI Yuanxiang, ZHU Xiaolei, *et al.* Rational design based on bioactive conformation analysis of pyrimidinylbenzoates as acetohydroxyacid synthase inhibitors by integrating molecular docking, CoMFA, CoMSIA, and DFT calculations[J]. *J Chem Inf Model*, 2007, 47(6): 2335–2344.
- [26] JI Fengqin, NIU Congwei, CHEN Chaonan, *et al.* Computational design and discovery of conformationally flexible inhibitors of acetohydroxyacid synthase to overcome drug resistance associated with the W586L mutation[J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3(8): 1203–1206.
- [27] CHEN Chaonan, LV Lili, JI Fengqin, *et al.* Design and synthesis of N-2,6-difluorophenyl-5-methoxyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]-pyrimidine-2-sulfonamide as acetohydroxyacid synthase inhibitor[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(8): 3011–3017.
- [28] CHEN Chaonan, CHEN Qiong, LIU Yuchao, *et al.* Syntheses and herbicidal activity of new triazolopyrimidine-2-sulfonamides as acetohydroxyacid synthase inhibitor[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(14): 4897–4904.
- [29] WANG Jianguo, XIAO Yongjun, LI Yonghong, *et al.* Identification of some novel AHAS inhibitors via molecular docking and virtual screening approach[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(1): 374–380.
- [30] WANG Jianguo, TAN Haizhong, LI Yonghong, *et al.* Chemical synthesis, *in vitro* acetohydroxyacid synthase (AHAS) inhibition, herbicidal activity, and computational studies of isatin derivatives[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(18): 9892–9900.
- [31] SHANG Jun, WANG Weimin, LI Yonghong, *et al.* Synthesis, crystal structure, *in vitro* acetohydroxyacid synthase inhibition, *in vivo* herbicidal activity, and 3D-QSAR of new asymmetric aryl disulfides[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(34): 8286–8293.
- [32] CHANG A K, DUGGLEBY R G. Herbicide-resistant forms of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants[J]. *Biochem J*, 1998, 33(3): 765–777.
- [33] LI Zaishun, WANG Weimin, LU Wei, *et al.* Synthesis and biological evaluation of nonsymmetrical aromatic disulfides as novel inhibitors of acetohydroxyacid synthase[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(13): 3723–3727.
- [34] GRANDONI J A, MARTA P T, SCHLOSS J V. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 42(4): 475–482.
- [35] GEDI V, YOON MY. Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors—a summary of their structure, biological activity and current status[J]. *FEBS J*, 2012, 279(6): 946–963.
- [36] PUE N, GUDDAT L W. Acetohydroxyacid synthase: a target for antimicrobial drug discovery[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(5): 740–753.
- [37] CHOI K J, YU Y G, HAHN H G, *et al.* Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(21): 4903–4910.
- [38] AWASTHY D, GAONKAR S, SHANDIL R K, *et al.* Inactivation of the *ilvB1* gene in *Mycobacterium tuberculosis* leads to branched-chain amino acid auxotrophy and attenuation of virulence in mice[J]. *Microbiology*, 2009, 155(9): 2978–2987.
- [39] SINGH V, CHANDRA D, SRIVASTAVA B S, *et al.* Biochemical and transcription analysis of acetohydroxyacid synthase isoforms in *Mycobacterium tuberculosis* identifies these enzymes as potential targets for drug development [J]. *Microbiology*, 2011, 157(1): 29–37.
- [40] WANG Di, PAN Li, CAO Gang, *et al.* Evaluation of the *in vitro* and intracellular efficacy of new monosubstituted sulfonylureas against extensively drug-resistant tuberculosis[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(5): 463–466.
- [41] PAN Li, JIANG Ying, LIU Zhen, *et al.* Synthesis and evaluation of novel monosubstituted sulfonylurea derivatives as antituberculosis agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 50: 18–26.
- [42] WANG Di, ZHU Xuelian, CUI Changjun, *et al.* Discovery of novel acetohydroxyacid synthase inhibitors as active agents against *Mycobacterium tuberculosis* by virtual screening and bioassay[J]. *J Chem Inf Model*, 2013, 53(2): 343–353.
- [43] KINGSBURY J M, YANG Z, GANOUS, T M, *et al.* *Cryptococcus neoformans Ilv2p* confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37°C and *in vivo* [J]. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1547–1558.
- [44] KINGSBURY J M, MCCUSKER J H. Cytocidal amino acid starvation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* acetolactate synthase (*ilv2Δ*) mutants is influenced by the carbon source and rapamycin[J]. *Microbiology*, 2010, 156(3): 929–939.
- [45] LEE Y T, CUI Changjun, CHOW E W L, *et al.* Sulfonylureas have antifungal activity and are potent inhibitors of *Candida albicans* acetohydroxyacid synthase[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(1): 210–219.

(责任编辑: 金淑惠)