

Brassinosteroid의 대사공학

이미옥 · 송기홍 · 이현경 · 정지윤 · 최빛나리 · 최성화*

서울대학교 자연과학대학 생명과학부

Metabolic Engineering of the Brassinosteroid Biosynthetic Pathways

LEE, Mi-Ock · SONG, Ki-Hong · LEE, Hyun-Kyung · JUNG, Ji-Yoon · CHOE, Vit-Nary · CHOE, Sunghwa*

School of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-747, Korea

ABSTRACT Sterols play two major roles in plants: a bulk component in biological membranes and precursors of plant steroid hormones. Physiological effects of plant steroids, brassinosteroids (BRs), include cell elongation, cell division, stress tolerance, and senescence acceleration. Arabidopsis mutants that carry genetic defects in BR biosynthesis or its signaling display characteristic phenotypes, such as short robust inflorescences, dark-green round leaves, and sterility. Currently there are more than 100 dwarf mutants representing 7 genetic loci in Arabidopsis. Mutants of 6 loci, *dwf1/dim1/cbb1*, *cpd/dwf3*, *dwf4*, *dwf5*, *det2/dwf6*, *dwf7* are rescued by exogenous application of BRs, whereas *bri1/dwf2* shares phenotypes with the above 6 loci but are resistant to BRs. These suggest that the 6 loci are defective in BR biosynthesis, and the one locus is in BR signaling. Biochemical analyses, such as intermediate feeding tests, examining the levels of endogenous BR, and molecular cloning of the genes revealed that *dwf7*, *dwf5*, and *dwf1* are defective in the three consecutive steps of sterol biosynthesis, from episterol to campesterol via 5-dehydroepisterol. Similarly, *det2/dwf6*, *dwf4*, and *cpd/dwf3* were shown to be blocked in D⁴ reduction, 22a-hydroxylation, and 23 a-hydroxylation, respectively. A signaling mutant *bri1/dwf2* carries mutations in a Leucine-rich repeat receptor kinase. Interestingly, the *bri1* mutant was shown to accumulate significant amount of BRs, suggesting that signaling and biosynthesis are dynamically coupled in Arabidopsis. Thus it is likely that transgenic plants over-expressing the rate-limiting step enzyme DWF4 as well as blocking its use by BRI1 could dramatically increase the biosynthetic yield of BRs. When applied industrially, BRs will boost new sector of plant biotechnology because of its potential use as a precursor of human steroid hormones, a novel lead compound for cholesterol-lowering effects, and a various application in plant protection.

Key words: Arabidopsis, cytochrome P450, dwarf, phytosterols, steroid hormones

브라시노 스테로이드 연구 역사

식물이 꽃을 피우고 성공적으로 수정하여 열매를 맺는 과정은 여러 가지 식물 호르몬이 작용할 것이라고 많은 사람들이 생각하여 왔다. 특히 꽃가루는 여러 식물 활성물질의 보고로 인식되어, 꽃가루에서 식물의 생장을 조절하는 물질을 분리하려는 노력은 1930년대에 시작되어 1970년대까지 계속되었다. 60여 종의 꽃가루를 체계적으로 분석한 결과 유채(*Brassica napus* L.)와 오리나무(*Alnus glutinosa* L.)의 꽃가루에서 추출한 물질이 식물의 생장을 촉진하는 데 매우 효과적

임을 밝혔다 (Mandava 1988). 이후 Mitchel과 Gregory는 1972년 Nature에 발표한 논문에서 유채로부터 정제한 Brassin이라는 물질이 작물의 생산량을 극대화시킨다고 보고하였다. 이 Brassin에 들어 있는 화학 물질의 구조는 1979년 Grove 등 (1979)이 역시 Nature에 발표한 논문을 통하여 밝혀졌다. 이들은 꿀벌이 모아온 약 220 kg의 꽃가루에서 10 mg의 순수한 물질을 정제하고 X-ray 회절법 등을 이용해 이 물질의 구조를 밝혀 내었다. 4개의 링구조를 바탕으로 4 곳에 히드록실기를 가지며 두 번째 링에 독특한 lactone기를 갖는 이 화합물을 이들은 "브라시노라이드 (BL)"로 명명하였다. 화학 구조상으

로 볼 때 곤충의 탈피 호르몬인 에크디손이나 사람의 스테로이드 호르몬과 비슷하며, 기능기의 개수, 위치, 광학 이성질체 등의 유무에 따라 여러 가지 유사 물질이 발견되었으며 이들을 총칭하여 브라시노 스테로이드 (BR) 라고 한다. 따라서 BL 는 BR의 일종으로 현재까지 발견된 BR중 가장 그 활성이 높은 물질이다.

BR의 구조가 밝혀진 이래 식물학자들은 BR이 식물의 발달에 미치는 생리학적 효과를 탐구하는 데 초점을 두고 연구를 진행하였다. 이러한 노력의 결과로 BR도 오옥신처럼 세포막에 있는 ATPase를 활성화시켜 세포벽의 산성화를 촉진시키는 것을 알아내었다 (Katsumi 1985). 한 가지 차이점은, 오옥신에 의한 세포 신장이 세포벽 구성 물질인 셀룰로스 생합성 억제제에 비교적 영향을 받지 않으나 BR에 의해 촉진되는 세포 신장은 이 억제제에 의해 크게 저해된다는 것이다 (Brummell and Hall 1985). 이러한 결과는 오옥신과 BR이 각기 독립적으로 작용한다는 것을 의미한다. 또한 흥미로운 것은 BR과 오옥신이 상승효과를 보인다는 것이다. 효과적인 BR bioassay 방법으로 알려진 rice lamina bending assay와 에틸렌 발생량 측정 실험 결과를 보면, 오옥신과 BR을 각각 따로 처리했을 때보다 BR을 먼저 처리한 후 오옥신을 처리하면 각각 처리한 결과의 합보다 그 크기가 더 커서 BR과 오옥신은

서로 상승효과를 유발할 수 있음이 알려지고 있다 (Takeno and Pharis 1982; Arteca et al. 1988; Yopp et al. 1981). 이는 여타의 다른 식물 생리학 현상에서도 잘 알려진 바와 같이 식물 호르몬은 다른 호르몬과 연합하여 작용하는 일체라고 볼 수 있다.

생합성 경로

BR의 생합성 경로는 비교적 잘 알려져 있다. BR의 생합성 과정은 최종 산물인 BL을 다량 생산하는 세포주로 알려진 일일초의 V208 라인을 이용해 주로 이루어 졌다. 이 세포주에 투여된 동위원소 표지 중간대사물이 어떻게 전환되는지를 추적하는 방식이 사용되었다 (Fujioka et al. 1995). BL은 스쿠알렌을 전구체로 하여 약 25단계의 효소반응을 거친 후 최종 산물로 만들어진다 (Figure 1).

BR은 테르펜류의 화합물로서 탄소수가 30여개인 tri-terpenoid에 속한다. farnesyl diphosphate (15C)가 두 개 중합되어 생성되는 squalene은 squalene oxidase에 의해 oxidosqualene으로 변형된다. 스테로이드 생합성 과정의 첫 번째 주목할만한 분지는 식물과 다른 생명체에서 서로 다른 squalene

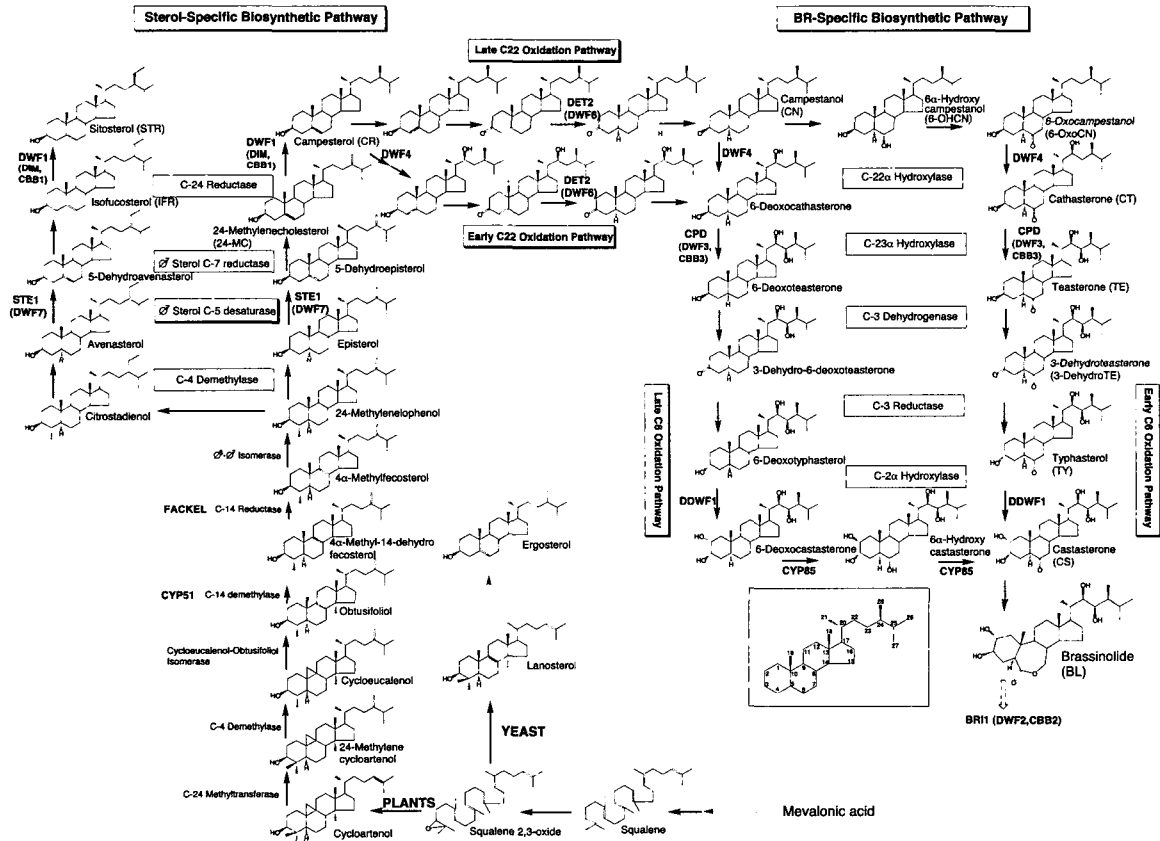


Figure 1. 브라시노라이드의 생합성 경로. 생합성 경로는 크게 스테롤 경로와 브라시노스테로이드 경로로 나누었다. 분지 되는 세부 경로와 주요 효소 반응은 사각형의 상자로 강조하였다. 효소 반응 중 해당하는 돌연 변이체가 있는 경우 굵은 글씨체로 이름을 붙여 놓았다. 오른쪽 하단부의 상자 안에는 스테로이드를 구성하는 탄소 원자의 번호를 매겨 놓은 것이다.

cyclase에 의해 축매된다. Oxidosqualene은 식물과 조류에서는 cycloartenol로 변형되지만 효모와 동물에서는 lanosterol로 진행하여 스테롤 합성이 이루어진다. 일련의 반응을 거친 스테롤은 24-methylenelophenol까지 도달하면 28번 탄소에 methylation이 되어 29개의 탄소를 갖는 C29 경로가 성립된다. 이렇게 하여 식물의 세포막에 존재하는 C29 스테롤인 stigmasterol 및 sitosterol, 그리고 추가적인 methylation 없이 생성되는 C28 스테롤인 Campesterol이 된다.

BR는 이와 같은 스테롤 전구체에 추가적인 산화와 환원반응이 일어나면서 생성된다. 먼저 campesterol은 상황에 따라 다음 둘 중 하나의 반응이 일어난다. 먼저, 5번 이중결합이 환원되어 단일 결합으로 만들어지는 반응이 일어나 campestanol이 합성되는 것이 있고 또 한가지는 campesterol의 22번의 탄소에 hydroxylation이 먼저 일어나는 반응 경로이다. 전자의 반응을 "late C22 hydroxylation 경로", 후자를 "early C22 hydroxylation 경로"라고 부른다. late C22 hydroxylation 반응의 결과 생성되는 campestanol은 다시 6번 탄소의 산화가 일어나는 선후에 따라 다시 "early C6 oxidation 경로"와 "late C6 oxidation 경로"로 나뉘는 분지가 일어난다. early C6 oxidation 경로를 따르게 되면 campestanol은 6번 탄소가 hydroxylation된 다음 ketone 그룹으로 산화되어 6-oxocampestanol이 만들어진다. 한편 late C6 oxidation 경로를 걷게 되면 campestanol은 22번 탄소가 먼저 산화되어 6-Deoxocathasterone으로 변형된다. BR의 생합성 과정은 순서대로, C22번과 C23번의 hydroxylation, 3번 탄소에 붙은 hydroxyl기의 epimerization, 2번 탄소의 hydroxylation, 그리고 마지막으로 6번과 7번 탄소 사이에 산소가 들어가는 Baeyer-Villiger type oxidation이 일어나며 BL가 생합성 된다.

지금까지 모두 40종 이상의 서로 다른 구조를 가진 BR가 발견되었다. 이 들은 하나의 최종산물을 생성하는 과정의 중간 대사 산물이거나 결과지의 구조가 BL의 것과는 다른 호모 BL 등의 유사체를 포함하고 있다. BL는 식물계에 광범위하게 존재하고 있으며 현재까지 조사된 모든 종의 식물에서 BR가 검출 되었다 (Fujioka and Sakurai 1997). 한가지 특이한 점은 종에 따라서는 생합성 경로의 최종 산물이라 할 수 있는 BL가 생성되지 않고 마지막 단계가 빠진 castasterone까지만 생성되는 식물이 있다는 것이다 (Yokota et al. 1991).

BL의 생합성 경로는 아직 완성되었다고 보기는 어렵다. 현재 하나의 효소 반응으로 보이는 단계가 실은 하나 이상의 복합적인 반응 단계일 수 있으며, 또한 early 및 late C6 oxidation 경로 이외에도 각각의 종적 반응 단계가 다시 거미줄처럼 뿔뿔로 연결될 가능성도 매우 높다 하겠다. 보다 완성도 높은 생합성 경로는 추가적인 생화학적 및 유전학적 연구 결과에 크게 의존한다고 할 수 있다.

생합성 돌연 변이체

BR 생합성 및 신호 전달 돌연 변이체는 애기장대의 경우 매우 특징적인 난쟁이 표현형을 보인다. BR 난쟁이들은 한결 같이 야생형에 비해 그 키가 20~30% 정도에 불과하며, 잎은 진녹색을 띠며, 모양은 타원형보다는 원형에 가깝다. 난쟁이 표현형의 정도가 상대적으로 약한 돌연 변이체는 씨를 맺을 수도 있지만 그 정도가 심한 경우에는 수술대가 암술대의 길이만큼 동일하게 자라지 않는 등의 이유로 열매를 맺지 못한다 (Figure 2). 난쟁이 표현형은 암소에서 자랄 때도 나타난다. 야생형의 유식물을 암소에서 키우게 되면 하배축이 길어지고 누르스름한 떡잎이 양쪽으로 벌어지지 않아 닫혀 있으며 정단부가 갈고리 모양으로 휘는 등의 특징적인 암형태 발생의 형질을 나타낸다. 그러나 정도가 심한 BR 난쟁이의 경우 하배축의 길이가 짧아지고, 황화된 떡잎이 벌어져 열리며 갈고리 모양의 정단부 구조도 발견할 수 없다 (Choe et al. 1998). 이러한 암형태발생적 특징 때문에 BR 난쟁이들은 광신호 전달 돌연변이체로 간주되기도 한다. 하지만 BR가 광형태발생을 억제하는 유일한 신호라는 데는 논란의 여지가 많이 남아 있다. 난쟁이 돌연 변이체가 암소에서 광형태 발생의 일부 특징적 표현형을 보이지만 이 돌연 변이체는 암소에서 엽록체를 발달시키지 못하며 (Azpiroz et al. 1998) 또한 BR을 첨가하면 하배축의 길이는 늘어나지만 정단부 갈고리 모양이 재생되지 않고 떡잎의 잎자루가 더 길어지면서 더 심하게 열리게 된다. 따라서 BR는 식물의 광 혹은 암형태 발생에서 길이생장 등의 일부분을 담당하는 호르몬으로 보이기는 하지만 이들 형태 발생에 있어서는 BR의 작용에 더불어 다른 호르몬들과의 관계에서 빚어지는 생리적인 현상이 더 중요한 것임을 간과해서는 안될 것이다.

생합성 경로에서 난쟁이 표현형을 보이는 돌연 변이체들은 순서대로 *dwarf7(dw7)*, *dwf5*, *dwf1*, *de-etiolated2(dw6)*, *dwf4*, *cpd/dwf3*가 있다. 이들은 각각 C5 desaturation, C7 reduction, C24 reduction, C4 reduction, C22 hydroxylation, 그리고 C23 hydroxylation 단계에 결함이 있다 (Choe et al. 1998; Choe et al., 1999a; Choe et al. 1999b; Li et al. 1996; Choe et al. 2000; Szekeres et al. 1996). 이들 단계 중 DWF4가 매개하는 C22 hydroxylation은 생합성의 속도 조절 단계로 알려져 왔다. 일일초의 V208 라인을 이용해 수행한 실험에 의하면 DWF4 단계 이전의 중간대사물인 6-Oxocampestanol은 Cathasterone에 비해 500배 이상 축적되나 생리 활성은 정반대로 Cathasterone이 6-Oxocampestanol보다 현저히 높은 것으로 밝혀졌다 (Fujioka et al. 1995). 애기장대의 경우 DWF4 유전자의 발현 정도는 극히 미미하여 일반적인 Northern 실험으로는 그 발현을 쉽게 조사할 수 없고 보다 민감한 실험 방법인 RT-PCR 분석에 의해 발현을 측정할 수 있었다. 이 DWF4 유전자를 과다발현 시킨 형질전환 식물체는 마치 BR을 처리한 식물과

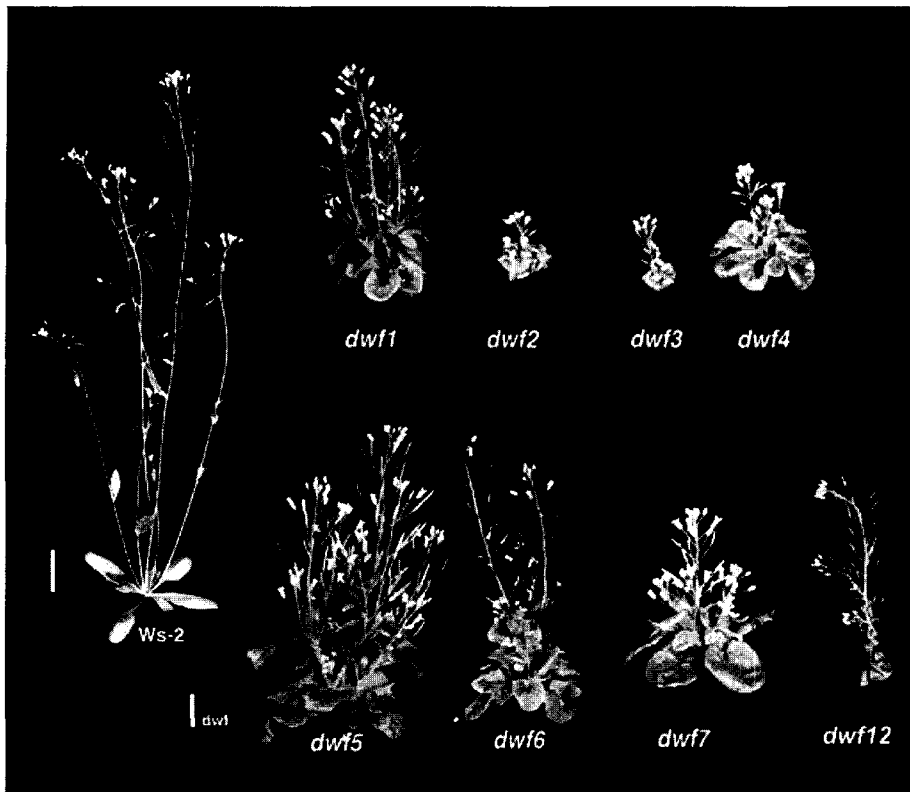


Figure 2. 애기장대의 브라시노스테로이드 난쟁이 돌연 변이체. 돌연 변이체들은 정도의 차이는 있지만 한결 같이 짧은 줄기를 가지며, 잎은 타원보다는 원형에 가깝고 짙은 녹색을 띤다. 대부분의 돌연 변이체들이 씨를 맺지 못하는 불임성을 보인다. 단위 막대는 1 cm를 의미. 난쟁이 돌연 변이체들의 다른 이름으로는 *dwf1/diminuto(dim)/cabbage1(cbb1)*, *bri1/dwf2/cbb2*, *cpd/dwf3/cbb3*, *det2/dwf6*, *dwf7/ste1*, *bin2/ucu1/dwf12* 가 있다.

같은 표현형을 보이는 것이 관찰 되었다. 하지만, 흥미로운 것은 내재 BL의 양에 있어서는 DWF4 과다발현 식물이 야생형의 경우 보다 낮다는 것이다 (Choe et al. 2001).

신호 전달에 결함이 있는 돌연 변이체들은 생합성 난쟁이들과 그 표현형이 동일하지만 BR에 의해 그 표현형이 복구되지 않는다. 즉, BR을 처리해도 이를 인식하거나 신호를 전달하는 데 결함이 있어 야생형으로 복구되지 않는다. 신호전달 돌연 변이체로는 *brassinosteroid-insensitive1 (bri1)/dwf2*가 있다. *bri1*는 조사 결과 다량의 BL를 축적하고 있음을 확인하였다 (Noguchi et al. 1999). 이러한 결과에 비춰 볼 때 *bri1*는 음성 되먹임 장치가 신호 전달에 맞물려 있어 정상적으로 작동하고 있지 않음을 추정할 수 있다.

Cytochrome P450

Cytochrome P450는 동물, 식물, 미생물 등 다양한 생명체에서 발견되며 거대한 구성원을 갖는 유전자 그룹이다. 이는 cytochrome P450 유전자가 계통 발생학적으로 볼 때 생물계가 분지 하기 이전 매우 오래 전에 구성되었으며, 각각의 기능에 따라 분화되어 왔음을 시사한다 (Nelson and Strobel 1987). 식물에 존재하는 Cytochrome P450는 구성 단백질의 1차 구조적 특성에 따라 크게 A형과 비A형으로 구분 지을 수 있다

(Paquette et al. 2000). 흥미롭게도 A형은 기능적인 면에서 식물 특이적인 효소반응을 - 세포벽 구성 물질의 생성, 식물 호르몬인 지베렐린이나 옥신의 생합성 등 - 매개하는 것을 알 수 있다. 비A형의 경우는 그 기질이나 대사 과정이 동물 등 여타의 다른 생명에서도 발견되는 공통적인 효소 반응을 촉매 하는 데 관여한다는 것을 파악할 수 있다 (Dursst and Nelson 1995).

Cytochrome P450는 420 nm 파장대의 빛을 흡수하는데 이 단백질이 기질과 결합하면 특징적인 450 nm 파장대의 빛을 흡수하기 때문에 이렇게 이름지어졌다. Cytochrome P450는 여러 가지 생화학적 반응을 매개하지만 가장 주목할 만한 것은 hydroxylation 반응이라 할 수 있다. BR 생합성에 관여하는 것으로 알려진 Cytochrome P450로는 CYP51, CYP90B1 (DWF4), CYP90A1 (CPD), CYP85 등이 있는데 이들은 모두 비A형으로 분류되며 CYP51이 탈 메틸 반응에 관여하는 것을 제외하면 CYP90B, CYP90A, CYP85는 각각 C22, C23, C6 hydroxylation을 매개하는 전형적인 P450라 할 수 있다. 생합성 경로에서 현재 마지막 단계를 비롯하여 그 유전자의 실체가 밝혀지지 않은 단계들이 많이 있는데 이들 중에 추가적으로 비A형의 cytochrome P450 유전자가 발견될 확률은 비교적 높다고 할 수 있다.

유전자 조작을 통한 BR의 대량 생산

유전자 조작을 통해 BR을 대량 생산할 수 있는 한가지 방법은 속도 조절 단계의 유전자인 DWF4를 강력한 프로모터에 결합시켜 그 발현 정도를 대량으로 올려 생합성 경로의 flux를 올리는 것이다. 실제로 DWF4 과다발현 식물체는 DWF4 이후의 중간 대사 산물의 양이 현저히 증가하는 것을 보여주어 경로의 flux가 증가하고 있음을 확인하였다 (Choe et al. 2001). 그러나 생리적인 활성이 가장 높은 최종 산물인 BL는 검출 가능한 최소치보다 낮았다. 이는 활성이 높은 BL가 대량으로 만들어지면 사용된 후 빠른 속도로 폐기될 수 있음을 추론할 수 있다. 현재 BR의 분해에 관계하는 효소로는 역시 비A형 cytochrome P450인 CYP72 (BAS1)을 들 수 있다. 이 효소는 C25를 hydroxylation 시켜 분해를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Neff et al. 1999). 그렇다면 BL가 정상적으로 사용되지 않는 경우는 BR이 축적될 수 있을 것으로 생각할 수 있는데, 이는 신호 전달 돌연 변이체일 것이다. 실제로 BR을 인식하거나 체내에서 신호 전달을 하는 과정에 결함이 있는 BRI1의 경우는 다량의 BR을 축적하고 있음이 확인되었다.

현재 가능한 BR의 대량 생산 모델로는 BR을 사용하지 못하는 신호전달 돌연변이체 내에 추가적으로 DWF4등의 생합성 관련 유전자를 과다 발현시키는 것을 상정할 수 있을 것이다. 여기에 BR의 분해에 관계하는 BAS1 유전자의 기능 또한 상실시킨다면 BR의 생산량을 최대화할 수 있을 것으로 생각된다. 한편, 앞으로는 아직 알려져 있지 않은 DWF4 단백질 수준의 개선, 예를 들면 활성 부위의 발견과 개선, allosteric regulation 기작의 규명과 단백질 공학을 이용한 효율 증진을 통해 BR의 생산을 극대화시킬 수 있으리라 생각된다.

결론 및 전망

BR을 농업적으로 살포한 후 작황을 조사한 예들을 보면 BR이 작물의 생산성을 제고하는데 크게 기여할 수 있음을 볼 수 있다 (참고문헌). 가령, BR을 벼에 처리하면 벼가 냉해를 극복하는 데 기여하고, 이삭수의 증가를 유도하였다. 토마토의 경우에서도 열매의 크기를 증가시킬 뿐 아니라 모양과 빛깔을 개선하여 상품가치를 증대시키는 것을 알 수 있었다 (참고문헌). 또한 식물 스테로이드는 사람의 체내에 투입될 경우 콜레스테롤의 흡수를 억제하는 고지혈증 예방효과를 보이는 것으로 알려져 있다 (Miettinen et al. 1990). 그리고 조제용으로 쓰이는 많은 종류의 스테로이드계 약품들이 식물의 스테로이드를 원료로 해서 만들어지고 있다. 따라서 대단위 조직 배양 등의 방법으로 식물 스테로이드의 생산을 극대화시킬 경우 이 신소재의 산업적 이용 가능성은 무궁무진하다고 할 수 있을 것이다.

사사 : 본 논문은 과기부 21세기 프론티어 연구개발사업의 작물유전체기능연구사업단, 한국과학재단 지정 식물대사연구센터, 및 농촌진흥청 바이오그린21 사업단에 의해 지원되었음.

인용문헌

- Arteca RN, Bachman JM, Mandava NB (1988) Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. *J Plant Physiol* 133:430-435
- Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA (1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10:219-230
- Brummell DA, Hall JL (1985) The role of cell wall synthesis in sustained auxin-induced growth. *Physiol Plant* 63:406-412
- Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA (1998) The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 10:231-243.
- Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA (1999a) The *Arabidopsis dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 119:897-907.
- Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA (2001) Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J* 26:573-582
- Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, Gregory BD, Ross AS, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA (1999b) The *Arabidopsis dwf7/ste1* mutant is defective in the Δ^7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 11:207-221.
- Choe S, Tanaka A, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ross AS, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA (2000) Lesions in the sterol Δ^7 reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J* 21:431-443.
- Durst F, Nelson DR (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabol Drug Interact* 12:189-206
- Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, Yanagisawa T, Yokota T, Sakurai A (1995) Biological activities of biosynthetically-related congeners of brassinolide. *Biosci Biotech Biochem* 59:1973-1975
- Fujioka S, Sakurai A (1997) Brassinosteroids *Nat Prod Rep* 14:1-10
- Grove MD, Spencer FG, Rohwedder WK, Mandava NB, Worley JF Jr JDW, Steffens GL, Flippen-Anderson JL Jr JCC (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from

- Brassica napus pollen. *Nature* **281**:216-217
- Kamuro Y, Takatsuto S** (1999) Practical application of brassinosteroids in agricultural fields. In: *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*. Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, (eds). Tokyo, Springer Verlag, pp. 163-190
- Katsumi M** (1985) Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA3 in the elongation of cucumber hypocotyl sections. *Plant Cell Physiol* **26**:615-625
- Li J, Nagpal P, Vatart V, McMorris TC, Chory J** (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**:398-401
- Mandava NB** (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* **39**:23-52
- Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA** (1990) Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* **131**:20-31
- Mitchell JD, Gregory LE** (1972) Enhancement of overall growth, a new response to brassins. *Nature* **239**:254
- Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, Chory J** (1999) *BASI*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:15316-15323
- Nelson DR, Strobel HW** (1987) Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol* **4**:572 - 593
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE** (1999) Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol* **121**:743-752
- Paquette SM, Bak S, Feyereisen R** (2000) Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol* **19**:307-317
- Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C** (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**:171-182
- Takeo K, Pharis RP** (1982) Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: an auxin-mediated phenomenon. *Plant Cell Physiol* **23**:1275-1281
- Yokota T, Ogino, Y, Suzuki H, Takahashi N., Saimoto H, Fujioka S, Sakurai A** (1991) Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids. In *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Application* Cutler HG, Yokota T, Adam G, (eds) American Chemical Society, Washington DC, pp. 86-96
- Yopp JH, Mandava NB, Sasse JM** (1981) Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays. *Physiol Plant* **53**:445-452