

강낭콩 (*Phaseolus vulgaris* L.) 종자성숙에 따른 지베렐린 수산화효소 활성의 변화

II. GA₁₂를 GA₁₅으로 변환하는 C20-Hydroxylase

郭尚洙·神谷勇治*·樓井成*·高橋信孝*

(한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실, *日本 理化學研究所)

Changes in Gibberellin Hydroxylase Activity during Seed Maturation of *Phaseolus vulgaris* L.

II. C20-Hydroxylase Converting GA₁₂ to GA₁₅

Kwak, Sang-Soo, Yuji Kamiya*, Akira Sakurai* and Nobutaka Takahashi*

(Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Research Institute,
Korea Institute of Science and Technology and

*The Institute of Physical and Chemical Research, Saitama, 351-01 Japan)

ABSTRACT

Changes in activity of gibberellin C20-hydroxylase which converts [¹⁴C]GA₁₂ to GA₁₅ were studied during seed maturation using the partially purified enzyme preparations of two cultivars, Kentucky Wonder (normal) and Masterpiece (dwarf) of *Phaseolus vulgaris*. The preparations obtained by methanol precipitation and hydrophobic interaction chromatography efficiently converted; GA₁₂ to GA₄ via GA₁₅, GA₂₄ and GA₉; GA₂₀ to GA₃, GA₅ and GA₆. The activities of C20-hydroxylase which converts GA₁₂ to GA₁₅ were almost the same in both cultivars. The C20-hydroxylase activity per protein reached a maximum at the very early immature seed stage, followed by a subsequent rapid decrease during seed maturation, whereas the enzyme specific activity per seed reached a maximum at 21 days after flowering, and showed a similar fluctuation to that of the 3β-hydroxylase which converts GA₂₀ to GA₃ during seed maturation.

서 론

지베렐린(GA)의 생합성연구에 관해서는 미생물과 식물체를 사용한 *in vivo* 실험에서 기본적인 경로가 밝혀져 있다(Graebe, 1987). 그러나 *in vivo* 실험에서는 투여한 기질이 생체내로의 침투율이 낮거나, 각 기관에 이동이 되지않으므로 이를 극복하기 위하여 생리적 농도를 넘는 고농도의 기질을 처리할 경우, 이상대사를 일으키는 등 많은 문제가 있다. 이런 문제를 해결하기 위하여 무세포계에 의한 GA 생합성 연구가 활발히 진행되어 콩과식물(Leguminosae)와 오이과식물(Cucurbitaceae)의 미성숙종자로부터 효소활성이 강한 무세포계가 개발되었다(Hedden, 1983).

현재까지의 *in vivo* 및 *in vitro*의 연구로부터 GA 생합

성은 mevalonic acid로부터 *ent*-kaurene까지의 초기단계, *ent*-kaurene으로부터 GA₁₂-aldehyde(GA₁₂-ald)까지의 중간단계 그리고 GA₁₂-ald로부터 각각의 GA 합성단계로 크게 나눌 수 있다. Mevalonic acid로부터 GA₁₂-ald까지의 생합성경로는 고등식물과 미생물에서 서로 같으나, GA₁₂-ald 이후의 생합성경로는 서로 다른 부분이 많다. 예를 들면, 3β-수산화는 식물에서는 생합성경로의 비교적 후기에 일어나지만 미생물에서는 생합성경로의 비교적 초기단계에서 일어난다(Kwak, 1988). 식물의 GA₁₂-ald 이후의 생합성경로에도 식물종류에 따라 다양성이 나타난다. 호박(*Cucurbita maxima*)의 미성숙종자에서는 13탄소 위치의 수산화경로가 결핍되어 있어, 주요 대사산물은 생리활성이 없는 탄소수 20의 GA(C₂₀-GA)인 GA₄₃이다(Graebe *et al.*, 1974).

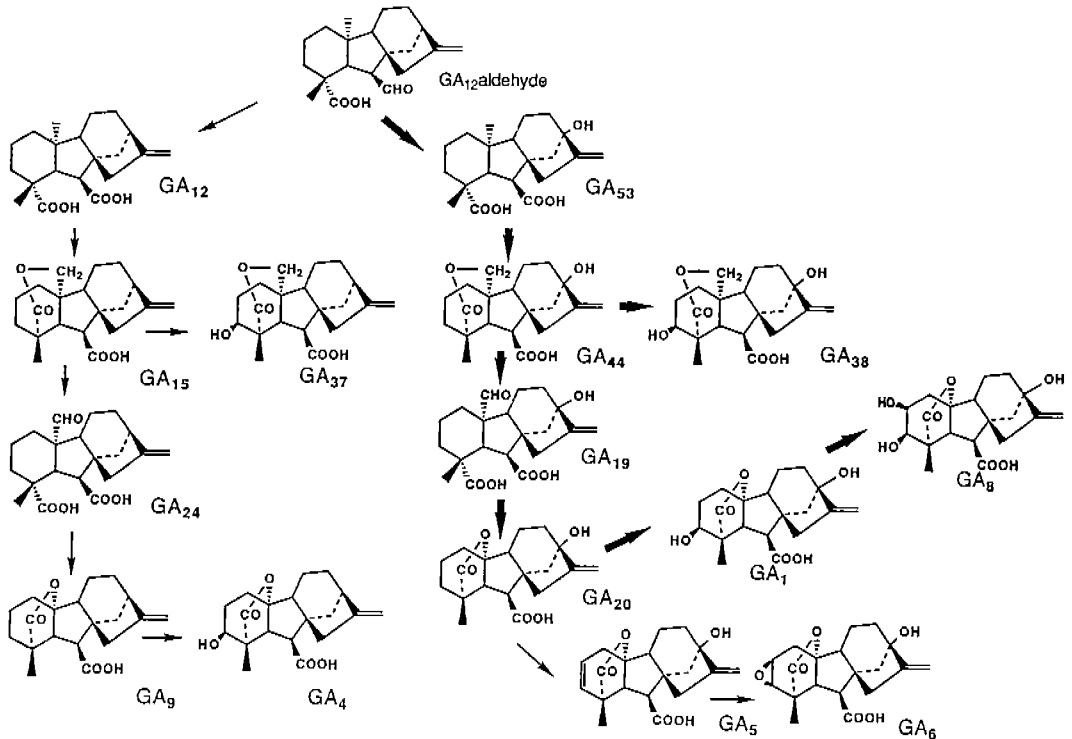


Fig. 1. GA biosynthetic pathways after GA_{12} -aldehyde in immature seeds of *Phaseolus vulgaris* (Takahashi *et al.*, 1986; Kwak *et al.*, 1988b). The pathways were refined by studies on the substrate specificity of 3β -hydroxylase. Thick arrows show the main pathway and light arrows show the minor pathway. All the intermediates were incubated in the cell-free system and products were identified by full-scan GC-MS. The δ -lactones of GA_{15} and GA_{44} were hydrolyzed with alkali before incubation for further oxidation. Conversion of GA_1 to GA_8 is catalyzed by 2β -hydroxylases (Smith and MacMillan, 1984).

완두콩(*Pisum sativum*)의 미숙종자에서는 C_{20} -GA로부터 활성형인 C_{19} -GA로의 변환은 효율적으로 일어나지만 3위치의 수산화경로가 결핍되어 있어 주요 대사산물은 GA_{20} 이다(Kamiya and Graebe, 1983). 이에 비해 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*)의 미성숙종자에서는 Fig. 1에서의 같이 3, 13 위치의 양 수산화경로가 존재하고 있어 주요 대사산물은 생리활성이 가장 높은 GA_1 이다(Takahashi *et al.*, 1986; Kwak *et al.*, 1988b).

일반적으로 콩과식물의 미성숙종자에는 많은 양의 각종 GA가 존재하고 있어 이들이 종자발육에 중요한 역할을 하고 있다고 생각되고 있다. 종자발육에 GA가 어떻게 관여하고 있는지를 밝히기 위한 연구로서 종자성숙에 따른 내생 GA 함량의 분석 및 GA 생합성효소 활성의 변화 등이 조사되고 있다(Coobaugh and Moor 1969; Smith and MacMillan 1986; Kwak *et al.*, 1988a). 본 연구에서는 강낭콩 미성숙종자의 종자성숙에 따른 GA_{12} C-20위치의 수산화효소 활성의 변화를 정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인

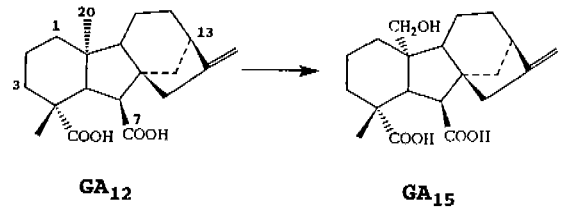


Fig. 2. The C-20 hydroxylation from GA_{12} to GA_{15} (open-lactone type). The numbers on GA_{12} structure denote the carbon number of *ent*-gibberellan skeleton.

Masterpiece의 두 미성숙종자로부터 부분 정제한 효소를 사용하여 GA 생합성에서 주요 중간체인 [^{14}C] GA_{12} (Fig. 2)을 기질로 하여 조사하였다.

재료 및 방법

주효소액의 조제 및 효소의 부분정제. 정상종인 Ken-

tucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece의 두 품종의 강낭콩(*P. vulgaris* L.)으로부터 성숙단계가 다른 6단계의 미성숙종자를 수확하여 GA 수산화효소를 조제하였다. 종자성숙에 따른 C-20 수산화효소 활성조사에는 메탄올 침전과 Butyl-Toyoppearl 6S을 이용한 소수성 크로마토그래피로 부분 정제한 3 β -수산화효소 활성분획을 사용하였다. 조효소액의 조제 및 부분 정제에 대해서는 Kwak 등(1992)에 상세히 기술하였다.

효소활성의 측정. 기질로 사용한 [14 C]GA $_{12}$ (4.33×10^3 GBq/mol)는 Graebe(1972)가 개발한 호박(*C. maxima*)의 무세포계를 사용하여 [2- 14 C]mevalonic acid(1.96×10^5 GBq/mol, Amersham)으로부터 조제하였다. C-20 수산화효소 활성의 표준반응액(200 μ l)은 효소액(100 μ l), ascorbate(0.5 M, 2 μ l), 2-oxoglutarate(0.5 M, 2 μ l), FeSO $_4$ (0.05 M, 2 μ l), 기질인 [14 C]GA $_{12}$ (500 Bq, 115 pmol, 2 μ l) 및 0.05 M 인산완충액(pH 8.0, 92 μ l)으로 조성되었다. 효소반응은 시험관(16.5 \times 105 mm)에 표준반응액을 넣고 30°C에서 1시간 동안 행하였으며, 이 조건에서 효소활성의 1 unit는 [14 C]GA $_{15}$ 가 3.8×10^{-11} mol 생성될 때로 정의하였다. 반응종료 후, 반응액에 증류수 0.8 ml를 넣고 5 N HCl로 pH 3으로 조정하고 1 ml의 아세톤을 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 이것에 ethyl acetate 1 ml를 넣고 교반한 후, 원심분리하였다. 상층액을 모은(ethyl acetate 추출을 3회) 후, 질소기류에서 농축하여 HPLC로 분석하였다.

HPLC에 의한 대사산물의 분석. HPLC분석은 on-line 고체 scintillation counter RLC-550(Aloka, Tokyo)이 접속된 역상크로마토그래피로 하였다. 농축한 시료를 메탄올 1 ml에 녹여 0.45 μ m FH-type Millipore filter로 여과한 후, Nucleosil ODS 5C $_{18}$ 컬럼(4.6 \times 100 mm)에 주입하였다. 대사산물은 0.05% 초산을 포함한 28% 메탄올로부터 77.5%까지 32분간 농도구배로, 40분까지는 77.5%의 메탄올로 하여 유속 1 ml/min로 용출하였다. 대사산물의 최종적인 정성분석은 Takahashi 등(1986)의 방법에 따라 실시하였다.

결 과

[14 C]GA $_{12}$ 의 대사. Butyl-Toyoppearl 컬럼에 의해 부분정제된 3 β -수산화효소활성분획은 [3 H] GA $_{20}$ 을 GA $_1$ 로 효율적으로 변환시킴과 동시에 2가철과 2-oxoglutarate를 요구하는 일련의 GA 수산화효소활성을 함유하고 있다 (Kwak *et al.*, 1992). 3 β -수산화효소 활성의 10 unit의 Butyl-Toyoppearl 활성구분과 [14 C]GA $_{12}$ 을 반응하였을 때 GA $_{12}$ 는 GA $_{15}$, GA $_{24}$ 을 경유하여 GA $_4$ 까지 변환되었으며 일부는 GA $_{15}$ 을 경유하여 GA $_{37}$ 으로 변환되었다(Fig. 3A). 한편 3 β -수산화효소 활성의 1 unit와 기질로 [14 C]GA $_{12}$ 을 반응하였을 경우, GA $_{12}$ 는 GA $_{15}$ 까지의 한단계의 C-20의 수산화반응만

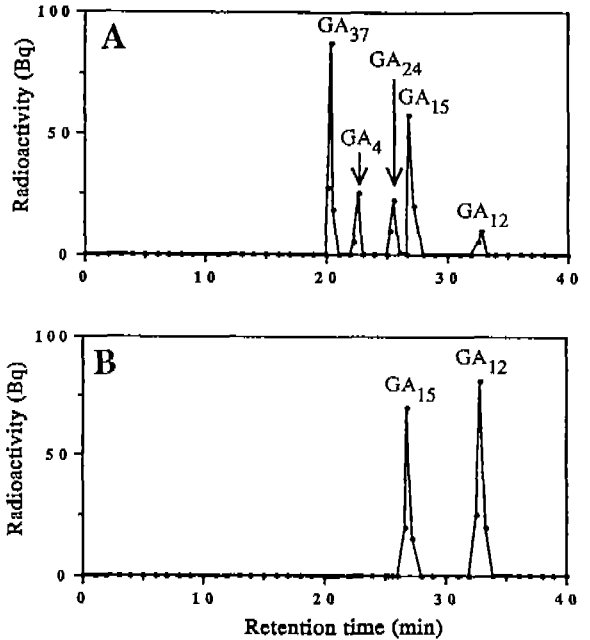


Fig. 3. HPLC chromatograms of products formed from [14 C]GA $_{12}$ by partially purified enzyme preparations. The chromatographic conditions were described in Materials and Methods). A, The conversions of GA $_{12}$ to GA $_4$ via GA $_{15}$, GA $_{24}$ and GA $_9$ by 10 units of 3 β -hydroxylase activity; B, The conversion of GA $_{12}$ to GA $_{15}$ by 1 unit of 3 β -hydroxylase activity.

일어났다(Fig. 3B).

종자성숙에 따른 GA C-20 수산화효소활성. 강낭콩(정상종인 Kenkucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece)미성숙종자의 각 생육단계로부터 부분정제한 GA 수산화효소의 조효소액을 사용하여 GA $_{12}$ 로부터 GA $_{15}$ 의 C-20 수산화효소 활성을 조사하였다. Fig. 4A, B에서와 같이 정상종과 왜성종 두 품종의 종자성숙에 따른 효소활성은 거의 같았다. 단위 단백질당 효소활성은 가장 미숙한 종자로부터 조제한 효소에서 가장 강한 효소활성을 보였으며 종자가 성숙함에 따라 현저히 저하하였다. 한편 종자 한 개당 효소활성은 종자가 성숙함에 따라 증가하여 개화 후 21일 전후에서 가장 높은 활성을 보였다. 그러나 종자가 더욱 성숙함에 따라 활성은 저하하였다.

고 찰

부분 정제한 GA 수산화효소를 사용한 GA $_{12}$ 의 대사. 강낭콩 미성숙종자의 각 성장단계로부터 조제한 조효소액을 사용하여 GA 3 β -수산화효소 활성을 조사한 결과 개화

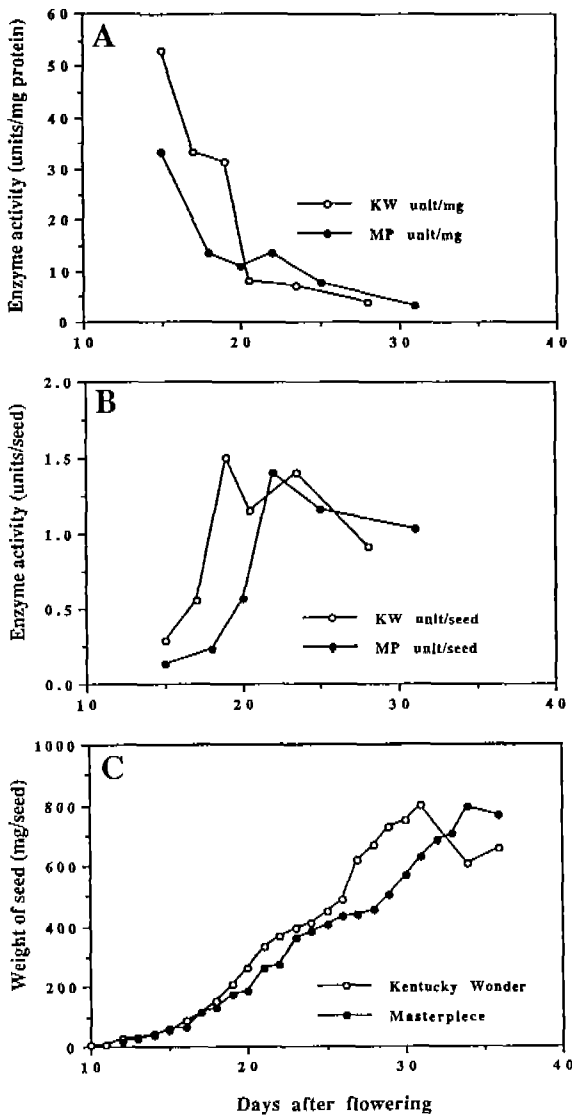


Fig. 4. Changes in the activity of gibberellin C20-hydroxylase converting [¹⁴C]GA₁₂ to GA₁₅ during seed maturation of two cultivars, Kentucky Wonder (KW, normal) and Masterpiece (MP, dwarf) of *Phaseolus vulgaris*. A, The C20-hydroxylase activity per mg protein; B, The C 20-hydroxylase activity per seed; C, Growth curves of seeds of *P. vulgaris*.

후 약 23일 이후의 성장단계로부터 조제한 효소액에서는 GA 생합성 억제물질이 혼재하여 있어 효소활성을 정확히 측정할 수 없었다(Kwak, 1988, Kwak *et al.*, 1988c). 따라서 효소를 어느 정도 정제하여 페놀성물질 등의 억제물질과 내생 GA를 제거한 후, 효소활성을 측정할 필요가 있었다.

강낭콩 미성숙종자로부터 조제한 GA 수산화효소의 조효소액으로부터 20% 에탄올 침전과 Butyl-Toyopearl 컬럼에 의한 소수성크로마토그래피로 3β-수산화효소를 포함한 2-oxoglutarate를 포함한 일련의 GA 수산화효소[EC 1.14.11.-]를 효율적으로 부분 정제할 수 있었다(Kwak *et al.*, 1992).

Butyl-Toyopearl 컬럼에 의해 부분 정제된 충분한 양(10 unit)의 3β-수산화효소 활성분획을 [¹⁴C]GA₁₂과 반응하였을 경우, GA₁₂는 GA₁₅, GA₂₄, GA₉으로 변환되었고 일부는 GA₄로까지 변환되었으나(Fig. 3A), 1 unit의 효소를 사용하였을 경우, GA₁₂는 GA₁₅까지의 한단계의 C-20위의 수산화반응만 일어났다(Fig. 3B). GA₁₂로부터 형성된 open-lactone 형의 GA₁₅는 더욱 산화되어 GA₂₄, GA₃₇로 대사되나 δ-lactone 형의 GA₁₅는 더이상 대사되지 않으므로 생체내에서는 open-lactone 형으로 존재하여 연속적으로 대사되는 것으로 사료된다(Takahashi *et al.*, 1986). 한편 GA 수산화효소 활성분획은 GA 생합성의 초기 전구물질인 [¹⁴C]mevalonic acid과 [¹⁴C]ent-karene을 기질로하여 대사를 조사하였으나 아무런 대사산물이 검출되지 않았다(자세한 메이터는 제시되지 않았음). 이는 GA₁₂ 이후의 GA 수산화효소와 GA 생합성 초기단계의 효소와는 다른 소수성을 나타냄을 시사한다. Butyl-Toyopearl 컬럼에 의한 정제는 GA₁₂ 이후의 일련의 2가 철과 2-oxoglutarate를 요구하는 GA 수산화효소를 그룹으로 정제할 수 있어 GA 수산화효소의 초기단계 정제법으로 효과적인 것으로 생각된다.

종자성숙에 따른 GA C-20 수산화효소 활성. GA₁₂부터 GA₄까지는 여러단계의 (수)산화과정이 관여하고 있어 각종의 중간체를 생성하는 조건에서 각 단계의 효소활성을 정확히 정량화하기가 어렵다. 따라서, GA₁₂로부터 GA₁₅의 C-20 수산화효소에 주목하여 GA₁₂로부터 GA₁₅까지 한 단계의 수산화반응만 일어나는 조건에서 강낭콩 종자성숙에 따른 효소활성 변화를 조사하였다. Fig. 4A, B는 정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece의 미숙종자에서 종자성숙에 따른 C-20수산화효소의 활성의 변화와 강약에는 차이가 거의 없음을 나타내었다. 이러한 결과는 전보에서의 3β-수산화효소 활성의 변화와 거의 같은 경향을 보인 것으로 해석된다(Kwak *et al.*, 1992).

일반적으로 콩과식물 등의 미성숙 종자에는 많은 양의 각종 GA가 존재하고 있어 GA가 종자발육에 어떤 역할을 하는지를 밝히기 위하여 종자성숙에 따른 내생 GA 함량의 분석 및 GA 생합성효소 활성의 추이를 조사하는 것이라 하겠다. 이러한 맥락에서 완두콩(*P. sativum*)과 나팔꽃(*Pharbitis nil*) 미성숙 종자로부터 조제한 조효소액을 사용하여 GA 생합성 초기단계의 전구체인 ent-karene 합성효소의 활성을 조사한 결과, 종자성숙 중간기에 최대치를 나타내다가 거의 완전 성숙종자에서 현저히 감소하였다

(Coolbaugh and Moor 1969; Barendse *et al.*, 1983). 강남콩 미성숙종자에서 GA 활성화단계인 GA₂₀의 3β-수산화 효소 활성의 경우는 본 연구의 C-20 수산화효소와 비슷한 추이를 나타내었으며, GA₁를 포함한 내생 GA 함량의 추이와 일치한 결과를 보였다(Kwak *et al.*, 1988a, 1992). 한편 완두콩과 강남콩에서 GA의 불활성단계인 GA₁로부터 GA₈의 2β-수산화효소 활성은 내생 GA 함량이 높은 거의 완전 성숙단계의 종자에서 최고치를 보였다(Smith and MacMillan, 1984, 1986). 이들의 결과는 내생 GA가 미성숙 종자의 발육을 조절하고 있음을 시사하는 것으로 보다 명확한 해석을 하기 위해서는 추후 이에 따른 생화학적, 분자생물학적 실험이 요구된다.

적 요

강남콩 두 품종(정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece)의 미성숙종자로부터 부분 정제한 GA 수산화효소를 사용하여 [¹⁴C]GA₁₂으로부터 GA₁₅의 효소활성의 변화를 조사하였다. 메탄올 침전과 수수성크로마토그래피에 의해 부분 정제된 GA 수산화효소 활성분획은 효율적으로 GA₂₀을 GA₁과 GA₅를 경유하여 GA₆으로, GA₁₂을 GA₁₅, GA₂₄, GA₉을 거쳐, GA₄로 변환시켰다. 두 품종의 종자성숙에 따른 GA₁₂로부터 GA₁₅의 C-20 수산화효소 활성의 변화와 강약에는 차이가 없었다. 단위 단백질당 C-20 수산화효소 활성은 종자가 성숙함에 따라 현저히 감소하였다. 한편 단위 종자당 효소활성은 개화 후 21일 전후에서 최대치를 나타내었는데 이는 GA₂₀의 3β-수산화효소 활성의 변화와 유사하였다.

사 사

본 실험은 日本 理化學研究所(RIKEN) 植物生活環制御研究室에서 수행한 것이다. 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해준 유장렬 박사에게 감사한다.

참 고 문 헌

Barendse, G.W.M., A. Dijkstra and T.C. Moore 1983 The biosynthesis of the gibberellin precursor *ent*-kaurene in cell-free extracts and the endogenous gibberellins of Japanese morning glory in relation to seed development. *J. Plant Growth Regul.* 2: 165-175.
Coolbaugh, R.C. and T.C. Moore 1969. Apparent changes

in rate of kaurene biosynthesis during development of pea seeds. *Plant Physiol.* 44: 1364-1367.
Graebe, J.E. 1972. The conversion of mevalonic acid into gibberellin A12-aldehyde in a cell-free system from *Cucurbita maxima* L. *Planta* 102: 261-271.
Graebe, J.E. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 419-465.
Graebe, J.E., P. Hedden, P. Gaskin and J. MacMillan 1974 Biosynthesis of gibberellins A₁₂, A₁₅, A₂₄, A₃₆ and A₃₇ by a cell-free system from *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* 13: 1433-1440.
Hedden, P. 1983. *In vitro* metabolism of gibberellins. In, The Biochemistry and Physiology of Gibberellins. A. Crozier (ed.). Vol. 1, Praeger Publishers. pp. 99-150.
Kamiya, Y. and J.E. Graebe. 1983. The biosynthesis of all major pea gibberellins in a cell-free system from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 22: 681-689.
Kwak, S.S. 1988. Chemical and biochemical studies on gibberellin biosynthesis enzymes in the higher plants. Ph.D. thesis. The Univ. of Tokyo. Japan. 167 pp.
Kwak, S.S., Y. Kamiya, M. Takahashi, A. Sakurai and N. Takahashi. 1988a. Metabolism of [¹⁴C]GA₂₀ in a cell-free systems from developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* 29: 707-711.
Kwak, S.S., Y. Kamiya, A. Sakurai, N. Takahashi and J.R. Graebe. 1988b. Partial purification and characterization of gibberellin 3β-hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* 29: 935-943.
Kwak, S.S., Y. Kamiya, A. Sakurai and N. Takahashi. 1988c. Isolation of a gibberellin biosynthesis inhibitor from testas of *Phaseolus vulgaris* L. *Agric. Biol. Chem.* 52: 149-151.
Kwak, S.S., Y. Kamiya, A. Sakurai and N. Takahashi. 1992. Changes in gibberellin hydroxylase activity during seed maturation of *Phaseolus vulgaris*. I. Gibberellin 3β-hydroxylase converting GA₂₀ to GA₁. *Korean J. Bot.* 35: 185-190.
Smith, V.A. and J. MacMillan. 1984. Purification and partial characterization of gibberellin 2β-hydroxylase from *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Growth Regul.* 2: 251-264.
Smith, V.A. and J. MacMillan. 1986. The partial purification and characterization of gibberellin 2β-hydroxylase from seeds of *Pisum sativum*. *Planta* 167: 9-18.
Takahashi, M., Y. Kamiya, N. Takahashi and J.E. Graebe. 1986. Metabolism of gibberellins in a cell-free system from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 168: 190-199.

(1992. 5. 13 接受)