

옥수수 유식물 싹에서 Brassinosteroid류의 동정 및 생합성 경로 추정

강민욱, 김영수, 김성기*
중앙대학교 생명과학과

Identification and Biosynthetic Pathway of Brassinosteroids in Seedling Shoots of *Zea mays* L.

Min-Wook Kang, Young-Soo Kim, Seong-Ki Kim*

Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT The potent biosynthetic precursors, 24α -methylcholesterol and 24α -methylcholestanol, and the endogenous brassinosteroids (BRs), castasterone (CS) and 6-deoxocastasterone (6-deoxoCS), were identified from shoots of maize seedlings. In addition, the presence for activities of several enzymes involved in the late C6-oxidation pathway from 24α -methylcholestanol to CS was demonstrated in the plants. However, activity for brassinolide (BL) synthase which catalyze the conversion of CS to BL, the last step of the late C6-oxidation pathway, was not detected in the enzyme solution obtained from the maize shoots. Together with the fact that BL was not identified from the maize shoots, these results strongly suggested that BRs in the maize shoots are biosynthesized during seedling growth and the active BR in the shoots is not BL but CS.

Key words: Biosynthesis, biosynthetic enzymes, brassinosteroids, the late C6-oxidation pathway, *Zea mays* L.

서 론

Brassinolide (BL)는 유채 (*brassica napus* L.)의 화분에서 처음으로 구조 결정된 steroid 계열의 물질로, 그 구조는 ($2\alpha, 3\alpha, 22R, 23R$)-tetrahydroxy- $24S$ -methyl-7-oxa- 5α -cholestane-6-one으로 밝혀졌으며 (Grove et al. 1979), BL과 그 관련 화합물을 brassinosteroid류 (BRs)로 총칭하며 하등 녹조류에서 종자식물에 이르기까지 식물계 전반에 걸쳐 약 40여 종이 폭 넓게 분포하고 있음이 보고되었다 (Fujioka 1999; Grove et al. 1979; Yokota 1997).

BRs의 생리 활성에 관한 초기 연구에서는, 외부에서 처리한 BRs가 세포의 신장과 분열을 촉진하고, 생식 기관과 유관속계 발달, 잎의 굴곡과 unrolling, 노화 조절, 스트레스 적응 조절, 세포막의 극성화 및 수소 이온 분비를 촉진하며, source/sink 상호 작용에 관여한다고 보고되었다 (Adam 1994;

Chory et al. 1996; Marquardt et al. 1991; Meudt 1987; Richter et al. 1991; Sakurai et al. 1993; Sasse 1991; 1997; Suzuki et al. 1985). 또한, 최근에 애기장대 (*Arabidopsis*), 토마토, 그리고 완두 등에서 BR-결핍 돌연변이체들 (BR-deficient mutants)이 발견되었으며, 이들은 생합성 과정의 이상에 의하여 줄기의 생장이 저해되고, 생식 능력이 저하되며, 노화가 지연되고, 유관속계의 비정상적 발달을 유도하는데, 이러한 돌연변이체들은 외부에서 BRs를 처리해 주어야 야생형으로 회복되는 사실로 보아 BRs는 식물의 성장과 분화에 필수적인 식물 호르몬임이 밝혀졌다 (Azapiroz et al. 1998; Choe et al. 1998; Clouse and Feldmann 1999; Fujioka et al. 1997; Li et al. 1996; Nomura et al. 1997; Sakurai et al. 1997; Szekeres et al. 1996).

모든 BRs는 5α -cholestane의 탄소 골격을 기본으로 구조적 다양성을 나타내는데, 이 중에서 C 24 -methyl 형의 C 28 -BRs가 식물계 내에 가장 넓게 분포하고 있으며, 이 중 BL이 가장 강한 생리활성을 나타낸다 (Fujioka 1999; Yokota 1997). 식물체 내에서의 C 24 -methyl BRs의 생합성 과정은 isotope을 표식한 중간대사 산물의 feeding 실험 (Yokota et al. 1990; Suzuki et al.

*Corresponding author Tel 02-820-5210 Fax 02-820-5206
E-mail skkimbio@cau.ac.kr

1995; Fujioka et al. 1995)과 BRs와 관계된 돌연변이체들의 분자 유전학적 분석 (Takahashi et al. 1995; Bishop et al. 1999; Szekeres et al. 1996; Choe et al. 1998)을 통하여 식물 sterol 중 C24-methyl BRs와 동일한 탄소 골격을 갖는 24 α -methylcholesterol (campesterol, CR)을 전구체로 하여 24 α -methylcholestanol (campestanol, CN)으로 전환된 이후에, 산화, 환원, 이성질체화, 그리고 수산화 등의 일련의 반응을 통해 가장 활성이 강하고 산화가 진행된 상태의 BL이 합성되어지는 것으로 알려져 있다 (Fujioka and Sakurai 1997). 또한 초기 C6 산화과정 (early C6-oxidation pathway)과 후기 C6 산화과정 (late C6-oxidation pathway)의 두 가지 생합성 과정이 확인되었다 (Abe et al. 1995; Choi et al. 1997; Suzuki et al. 1995).

본 연구는 상기의 BRs 생합성 연구 결과들을 토대로 아직까지 조사되지 않은 식물 발아 후 성장 초기의 BRs 생합성 과정을 밝히고자 하였다. 특히 BRs의 결핍에 의하여 줄기의 신장이 현저하게 억제됨에 주목하여, 옥수수 유식물을 대상으로 줄기생장 시, 정상적인 줄기생장을 위하여 BRs가 어떻게 생합성 되는지를 조사하고자 하였다. 이를 위하여 옥수수 유식물 줄기 내의 BRs와 BRs 생합성 전구물질의 동정, 동정된 BRs의 생합성 과정에 관여하는 효소변환을 조사하여 유식물 생장 시 BRs가 생합성 되는지, 아니면 발아종자로부터 전달되는지를 확인하고자 하였다. 또한 옥수수에서는 아직까지 BL의 동정이 이루어지지 않고 있어 (Kim et al. 2000; Gamoh et al. 1990; Sekimoto et al. 1997; Suzuki et al. 1986) 옥수수 유식물 발아와 줄기 신장에 관여하는 활성형 BR은 무엇인지를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 생장조건

옥수수 (*Zea mays* L., Golden cross bantam) 종자를 흐르는 물에 충분히 세척한 후, 기포 발생기가 장치된 수조 속에서 24시간 발아 시켰다. 그 후 수분 유지 처리된 거즈 위에서, 25°C를 유지하면서 3일간 생육시킨 후 줄기만 잘라서 사용하였다.

Bioassay

옥수수 줄기의 내생 BRs 활성을 검출하기 위한 rice lamina inclination assay는 벼 (*Oryza sativa* var., Koshikari) 종자를 사용하여 Arima 등 (1984)의 방법으로 행하였다.

옥수수 줄기의 내생 BRs의 동정

옥수수 줄기의 내생 BRs를 분리하기 위하여 옥수수 줄기 (1,320 g)를 blender를 이용하여 80% 메탄올 (MeOH)로 분쇄

후, 반복 추출하였다 (500 mL×4). 이 추출물들은 rotary evaporator로 감압농축 건조한 후, 얻어진 추출물들에 대하여 증류수와 CHCl₃ 각 800 mL로 4회 반복 solvent-partitioning 하였으며, 얻어진 CHCl₃ 가용분획에 내생 BRs의 정제를 용이하게 하고, 확인된 BRs의 정량을 위하여 [³H]₆로 표지한 BL, CS, typhasterol (TY), teasterone (TE), 6-deoxoCS를 각각 500 ng씩 첨가하였다. 모아진 CHCl₃ 가용분획은 감압농축 건조하고, 다시 *n*-hexane과 80% MeOH 각 500 mL로 solvent-partitioning 하여, *n*-hexane 분획은 sterol 분석에 이용하였으며, 80% MeOH 가용분획을 감압농축 건조한 후, ethyl acetate (EtOAc)와 sodium phosphate buffer (pH 7.8)로 solvent-partitioning하여 BRs를 포함하는 EtOAc 가용분획을 얻었다.

EtOAc 가용분획을 최소량의 CHCl₃에 녹여 silica gel column chromatography (C. C.) (silica 20 g)를 수행하였다. CHCl₃과 MeOH의 비율은 100% chloroform, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100% MeOH까지 각각 200 mL씩 차례로 흘려주었으며, 얻어진 분획들은 bioassay를 통해 BRs 활성을 측정하였다. 높은 활성을 보인 분획들 (4~6%)만을 모아 Sephadex LH-20 C. C. (bed volume 240 mL; 22×900 mm)를 수행하였다. 이때 용출 용매로서 MeOH와 CHCl₃의 비가 4 : 1인 혼합용액을 사용하였으며, 분당 0.5 mL의 유속으로 흘려주었다. Bioassay를 통해 활성이 강한 39~40분획 (Ve/Vt = 0.65~0.75)을 모아 감압 농축한 후, reversed phase HPLC (Senshu Pak, Pegasil-B ODS, 10×150 mm)를 이용하여 정제하였다. 용출 용매는 50% acetonitrile (MeCN) 용액을 일정하게 25분간 흘려주었으며, 40분까지 100% MeCN으로 농도 구배를 주어, 분당 2 mL의 유속으로 흘려주었다. 얻어진 분획들은 bioassay를 통해 BRs 활성을 측정하였으며, 얻어진 활성 분획은 gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)/GC-selected ion monitoring (SIM)으로 분석하기 위해 bismethanboronate (BMB)체화하거나, methanboronate-trimethylsilylate (MB-TMSi) ether체화하였다. 구조 분석을 위한 GC-MS는 GC (HP 6890)-MS (HP 5973: ionization voltage 70 eV)를 사용하였다. GC column으로는 HP-5 (0.25 mm×30 m, 0.25 μ m film thickness, 5% PHME siloxane) column을 사용하였으며, 이 때 GC의 조건으로 on-column injection mode, carrier gas는 He 1 mL/min, inlet 온도는 280°C, oven 온도는 175°C에서 2분간 유지시킨 후, 280°C까지 매 분 40°C씩 상승시켜 280°C로 유지시켰다.

옥수수 줄기의 내생 4-demethylsterol의 동정

n-Hexane 가용분획을 농축 건조하여, 5% KOH를 포함하는 80% ethanol (EtOH)에 녹여 90분간 70°C로 가열하여 지질 화합물의 비누화반응 (saponification)을 행하였다. 반응 후, 반응액을 냉각시킨 다음 *n*-hexane 500 mL을 첨가하여 unsaponified lipid를 3회 반복 추출하였다. Unsaponified lipid는 다시 최소량의 *n*-hexane에 녹여 20 g의 SiO₂가 채워진 column (30×400

mm)위에 loading하고 *n*-hexane과 dichloromethane의 1 : 1 혼합용액을 이용하여 용출하였다. Silica gel C. C. 후 얻어진 각 분획들은 stigmasterol과 cholesterol을 4-demethylsterol의 표준물질로 하여 F254 preparative silica TLC plate (Merck Co.)로 분석하였다. 전개 용매로는 dichloromethane을 사용하였으며, 70% H₂SO₄를 뿌린 후 열처리한 뒤 UV 365 nm하에서 관찰한 후, 표준물질 4-demethylsterol과 같은 Rf 값을 갖는 분획들을 모아 4-demethylsterol 분획을 얻었다. 4-demethylsterol 분획을 농축 건조한 후, 1 mL의 acetic anhydride와 2 mL의 pyridine의 혼합 용액에 녹여 실온에서 1일간 반응시켰다. 이후 반응액을 회염산 (pH 3.0)으로 산도를 pH 7로 조정하고, 다시 200 mL의 *n*-hexane으로 3회 반복 추출하여 acetylation된 4-demethylsterol 분획을 얻었다. *n*-Hexane으로 추출한 4-demethylsterol 분획을 GC-MS로 분석하였다.

효소변환에 의한 생합성 과정의 확인

효소원 조제의 모든 과정은 4°C를 유지하면서 수행하였으며, 옥수수 줄기 (30 g)를 해사와 혼합한 뒤, 2배 부피의 cold homogenization buffer를 사용하여 cold pestle과 mortar로 마쇄하였다. Homogenization buffer는 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 15 mM 2-mercaptoethanol, 15% glycerol, 250 mM sucrose, 1% insoluble polyvinylpyrrolidone 그리고 40 mM ascorbate를 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 사용하였다. Homogenate를 15,000×g에서 30분간 원심분리 (Jouan SR 20. 22) 한 후, 그 상정액만을 모아 다시 190,000×g에서 60분간 초고속 원심분리 (Kontron Centrifon T-1180) 하였다. 상정액은 cold acetone (최종농도 40%)을 첨가하여 -25°C에서 20분간 유지시킨 후, 13,000×g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 이를 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol을 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 재현탁하여 cytosolic 효소원으로 사용하였다. Pellet은 homogenization buffer에 재현탁하여 다시 190,000×g에서 60분간 초고속 원심분리하였다. Pellet만을 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol을 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 재현탁하여 microsomal 효소원으로 사용하였다. 조제된 microsome과 cytosol 효소원의 단백질 양은 Bradford 방법으로 정량하였다 (Bradford 1976).

CN 22(*R*)-hydroxylase, 6-deoxoTE dehydrogenase/6-deoxo-3-DHT reductase, 6-deoxoCS oxidase 그리고 BL synthase에 의한 촉매 반응을 위한 표준 assay mixture는 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어 있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁된 6 mg protein의 crude cytosolic solution 또는 microsomal solution에 95% EtOH에 녹인 기질인 CN, 6-deoxoTE, 6-deoxoCS, 그리고 CS을 각각 5 µg과 증류수에 녹인 4.8 mM NADPH를 넣어 total 1.2 mL volume으로 구성하였다. 모든 assay는 두 번씩 행하였다. Incubation은

NADPH의 첨가에 의해 개시하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 30분 후 1.2 mL의 water-saturated EtOAc를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, [C26, 28-²H₆]-BR (6-deoxoCT, 6-deoxoTY, CS, BL)을 각각 50 ng씩을 효소 반응액에 각각 첨가하여, GC-SIM 분석시 정량 분석을 위한 표준물질로서 사용하고자 하였다

1.2 mL의 EtOAc 첨가에 의해 incubation이 종료된 EtOAc와 buffer 혼합용액을 vortex 후 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상등액인 EtOAc 층을 얻었으며, 동일한 방법으로 3회 반복 추출하여 얻은 EtOAc 층을 모아 감압농축 건조하였다. 감압으로 농축 건조된 EtOAc 분획을 50% MeOH에 녹여 C18 cartridge (Sep-Pak Plus C18, Waters) column을 이용하여 분리 정제하였으며, 이 때, C18 cartridge는 최종적으로 50% MeOH로 equilibrium 시킨 후, 반응 산물의 용출은 50% MeOH 5 mL, 100% MeOH 5 mL씩 차례로 흘려주었으며, 이 때의 100% MeOH 분획만을 수집하여 농축 · 건조하였다.

Sep-Pak C18 cartridge column을 통하여 얻어진 6-deoxoCS oxidase와 BL synthase의 효소 반응 대사산물은 reversed phase HPLC column (Novapak C18, 8×100 mm)을 이용하여 정제를 하였으며, 용출 용매로는 45% MeCN 용액을 1 mL/min의 유속으로 흘려주었으며, CN 22(*R*)-hydroxylase, 6-deoxoTE dehydrogenase/6-deoxo-3-DHT reductase의 효소반응 대사산물은 reversed phase HPLC column (Senshu Pak, Pegasil-B ODS, 10×150 mm)을 사용하였으며, CN 22(*R*)-hydroxylase의 용출용매로는 100% MeOH 용액을 2 mL/min의 유속으로 흘려주었으며, 6-deoxoTE dehydrogenase/6-deoxo-3-DHT reductase의 용출용매로는 100% MeCN 용액을 2 mL/min의 유속으로 흘려주었다. HPLC 후 얻어진 분획을 GC-SIM으로 분석하기 위하여 BMB 또는 MB-TMSi ether체화하였다.

결과 및 고찰

옥수수 유식물 줄기 내 BRs의 동정

Figure 1에 나타난 것과 같이 rice lamina inclination assay에서 다수의 활성 분획들이 확인되었는데, 이 분획들의 retention time (Rt)이 동일 조건 하에서 행한 HPLC의 표준물질 BL, CS, TE, TY, 6-deoxoCS의 Rt와 일치함을 근거로, I에는 표준물질로 첨가한 [²H₆]-BL, II에는 [²H₆]-CS, III에는 [²H₆]-TE, IV에는 [²H₆]-TY, 그리고 V에는 [²H₆]-6-deoxoCS가 포함되어 있을 가능성이 크다고 사료되어, 이 표준물질과 함께 [²H₆]-BRs, 즉 내생 BRs가 존재하는지를 GC-MS를 통하여 정성 및 정량 분석을 행하였다.

먼저 [²H₆]-CS일 가능성이 큰 활성분획 II에 대해 BMB체로 만든 후, GC-SIM으로 분석한 결과, [²H₆]-CS BMB에서 유래된 ion들 (*m/z* 518과 161)을 제외하고, 분자량 ion peak가 *m/z* 512에, C24-methyl기를 함유하는 BR-BMB체의 특징적인 ion

peak인 m/z 155 (C20-22의 분열)가 base peak로, 6-keto BRs의 특징적인 ion peak들인 m/z 358, 327 그리고 287의 ion peak들이 확인되었으며, 이들 ion peak들은 합성 $^2\text{H}_6$ -CS-BMB체와 동일한 ion chromatogram과 GC Rt를 나타내어 HPLC 활성 분획 II 내에는 표준물질로 첨가한 $^2\text{H}_6$ -CS와 함께 내생의 $^2\text{H}_6$ -CS가 포함되어 있음을 확인하였다. 또한 내생 $^2\text{H}_6$ -CS의 함량은 표준물질로 첨가한 $^2\text{H}_6$ -CS와의 비교를 통하여 0.23 ng/g fr wt로 확인되었다 (Table 1).

표준물질 $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS이 포함되어 있을 가능성이 큰 활성분획 V에 대한 GC-SIM 분석을 실행한 결과, $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS BMB의 주요 ion peak들과 함께 중요 ion들에서 6 mass 줄어든 ion들, 즉 m/z 498[M⁺], 483 그리고 155가 확인되었으며 그 GC Rt는 합성 $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS와 일치하며, 분획에는 표준

물질로 첨가한 $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS와 내생형의 $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS가 포함되어 있음을 확인되었다. 그 내생 함량은 $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS와 비교한 결과 3.8 ng/g fr wt로 확인되었다 (Table 1).

한편 HPLC 분획 I, III, 그리고 IV의 GC-MS 분석에서는 각각의 얻어진 MS 또는 SIM ion chromatogram에서 각각 $^2\text{H}_6$ -BL, $^2\text{H}_6$ -TE 그리고 $^2\text{H}_6$ -TY만이 검출되고, 내생형인 $^2\text{H}_6$ -BL, $^2\text{H}_6$ -TE 그리고 $^2\text{H}_6$ -TY는 검출되지 않아 이들 BRs는 옥수수 유식물 줄기에는 이들 BRs가 포함되어 있지 않음을 확인하였다.

옥수수 유식물 줄기 내 BRs의 생합성 전구물질의 동정

Total ion chromatogram (TIC) 상에 24-methylcholesteryl acetate로 사료되는 peak가 나타났으며, mass spectrum을 해석한 결과, 일반적으로 5 α -4-demethyl acetate의 경우, 분자량 [M⁺] ion이 나타나지 않고 [M-AcOH]⁺의 ion이 base peak로 나타나는 사실과 일치하는 [M-AcOH]⁺의 ion이 m/z 382가 나타나 본 화합물의 분자량은 442일 것으로 사료되었다. 또한 [M-AcOH]⁺와 side chain 사이의 분열에 의한 m/z 255 peak가 보였는데, 이는 보통 side chain이 unsaturated된 steryl acetate의 경우 C24-C28 위치 사이의 이중결합이 없을 경우 나타나는 특징적인 ion peak로서 본 화합물은 side chain이 saturated된 24-methylcholesteryl acetate일 가능성이 높다고 사료되었으며, 그 가능성은 표준물질 24-methylcholesteryl acetate와 직접적인 GC-MS 분석 비교에 의하여 확인되었다 (Table 2). 즉 옥수수 내생 BRs의 전구물질인 CR이 존재함을 확인하였다. 또한 campestanyl acetate의 특징적인 peak인 m/z 215, 257, 384, 그리고 444 peak를 나타내는 화합물이 측정되었으며, 이 mass spectrum과 GC Rt는 동일 조건하의 GC-MS 분석시 표준물질 campestanyl acetate의 결과와 일치하였다. 즉, 옥수수 줄기 내에서 campes-

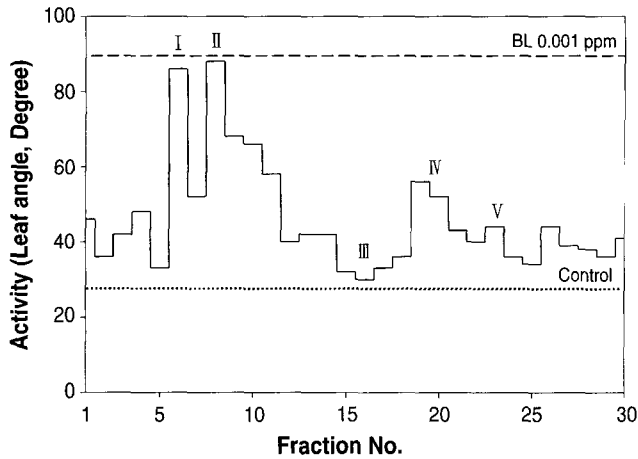


Figure 1. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination assay after a reversed phase HPLC in extracts of maize shoot seedlings.

Table 1. GC-SIM data for authentic and endogenous brassinosteroids (BRs) in shoots of maize

Compound*	Rt** (min) on GC	Prominent ions (m/z, relative intensity %)
$^2\text{H}_6$ -CS	26.96	518 (M ⁺ , 84), 441 (16), 358 (24), 287 (39), 161 (100)
Endogenous $^2\text{H}_6$ -CS	27.20	512 (M ⁺ , 84), 358 (16), 327 (24), 287 (39), 155 (100)
Authentic $^2\text{H}_6$ -CS	27.20	512 (M ⁺ , 84), 358 (16), 327 (24), 287 (39), 155 (100)
$^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS	19.59	504 (M ⁺ , 28), 489 (20), 161 (100)
Endogenous $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS	19.70	498 (M ⁺ , 24), 483 (19), 155 (100)
Authentic $^2\text{H}_6$ -6-deoxoCS	19.70	498 (M ⁺ , 29), 483 (20), 155 (100)

* Compound was analyzed as a bismethaneboronate derivative.
** Retention time.

Table 2. GC-MS data for endogenous and authentic 24 α -methylcholesterol and 24 α -methylcholestanol in shoots of maize

Compound*	Rt** (min) on GC	Prominent ions (m/z, relative intensity %)
Endogenous 24-methylcholesterol	22.85	382 (M ⁺ -60, 100), 367 (30), 274 (14), 260 (12), 255 (15), 213 (14)
Authentic 24-methylcholesterol	22.85	382 (M ⁺ -60, 100), 367 (31), 274 (13), 260 (12), 255 (17), 213 (14)
Endogenous 24 α -methylcholestanol	27.29	444 (M ⁺ , 22), 384 (39), 369 (31), 276 (33), 257 (10), 215 (100)
Authentic 24 α -methylcholestanol	27.29	444 (M ⁺ , 23), 384 (43), 369 (31), 276 (32), 257 (11), 215 (100)

* Compound was analyzed as a derivative of acetate.
** Retention time.

tanol의 존재를 확인하였다 (Table 2).

옥수수 유식물 줄기 내 생합성 효소의 존재 확인

상기의 실험을 통하여 옥수수 유식물 줄기에 BRs의 생합성 전구 물질인 CR과 CN이 존재함을 확인하였다. 또한 내생 BRs로서 후기 C6 산화 과정의 주된 BRs인 6-deoxoCS와 CS가 동정되었으나, 초기 C6 산화 과정에 포함되는 BRs는 동정되지 않았다. 이는 옥수수 유식물의 줄기 생장에 있어 내생 BRs는 후기 C6 산화 과정에 의하여 생합성되고 있음을 나타내는 결과라 사료되었다. 그러나 본 실험에서 확인된 6-deoxoCS와 CS 및 이들의 생합성 전구물질인 CR과 CN은 이미 옥수수 종자로부터도 동정된 화합물들로서, 옥수수 유식물 줄기 생장에 필요한 BRs가 옥수수 종자로부터 생합성된 후 이동해 온 것인지 아니면 옥수수가 줄기 생장을 위하여 줄기 자체에서 생합성 한 것인지는 확실하지 않았다. 이에 옥수수 줄기가 자체적으로 필요에 의하여 BRs를 생합성 할 가능성을 조사하기 위하여 옥수수 줄기 유식물에 내생 BRs의 생합성을 위한 후기 C6 산화 과정의 몇몇 중요한 반응들을 촉매하는 효소들이 유식물 줄기내에 존재하는지를 조사하였다.

CN 22(R)-hydroxylase의 활성

BRs의 후기 C6 산화 과정의 rate limiting 단계로 알려진 CN에서 6-deoxoCT로의 전환을 촉매하는 CN 22(R)-hydroxylase의 존재를 확인하기 위하여 GC-SIM에 의한 분석결과, 내부 표준물질인 [²H₆]-6-deoxoCT TMSi 유도체의 특징적인 peak인 m/z 462와 193과 함께 효소 산물인 [²H₀]-6-deoxoCT TMSi 유도체의 특징적인 peak인 m/z 456과 187을 확인되었는데, [²H₀]-6-deoxoCT TMSi의 GC Rt는 합성 [²H₀]-6-deoxoCT TMSi와 일치하여, 옥수수 유식물 줄기에 존재하는 CN 22(R)-hydroxylase에 의하여 CN이 6-deoxoCT로 전환되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 2A).

6-DeoxoTE dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase의 활성

후기 C6 산화 과정에서 6-deoxoTE로부터 6-deoxoTY로의 변환은 6-deoxo-3-DHT를 매개로한 2단계의 C3-epimerization 반응이다. 이 C3-epimerization에서 6-deoxoTE로부터 6-deoxo-3-DHT로의 변환은 2개의 proton을 잃는 dehydrogenation 반응으로, 이는 dehydrogenase에 의하여 촉매 되어지며, 6-deoxo-3-DHT에서 6-deoxoTY로의 반응은 2개의 proton을 얻는

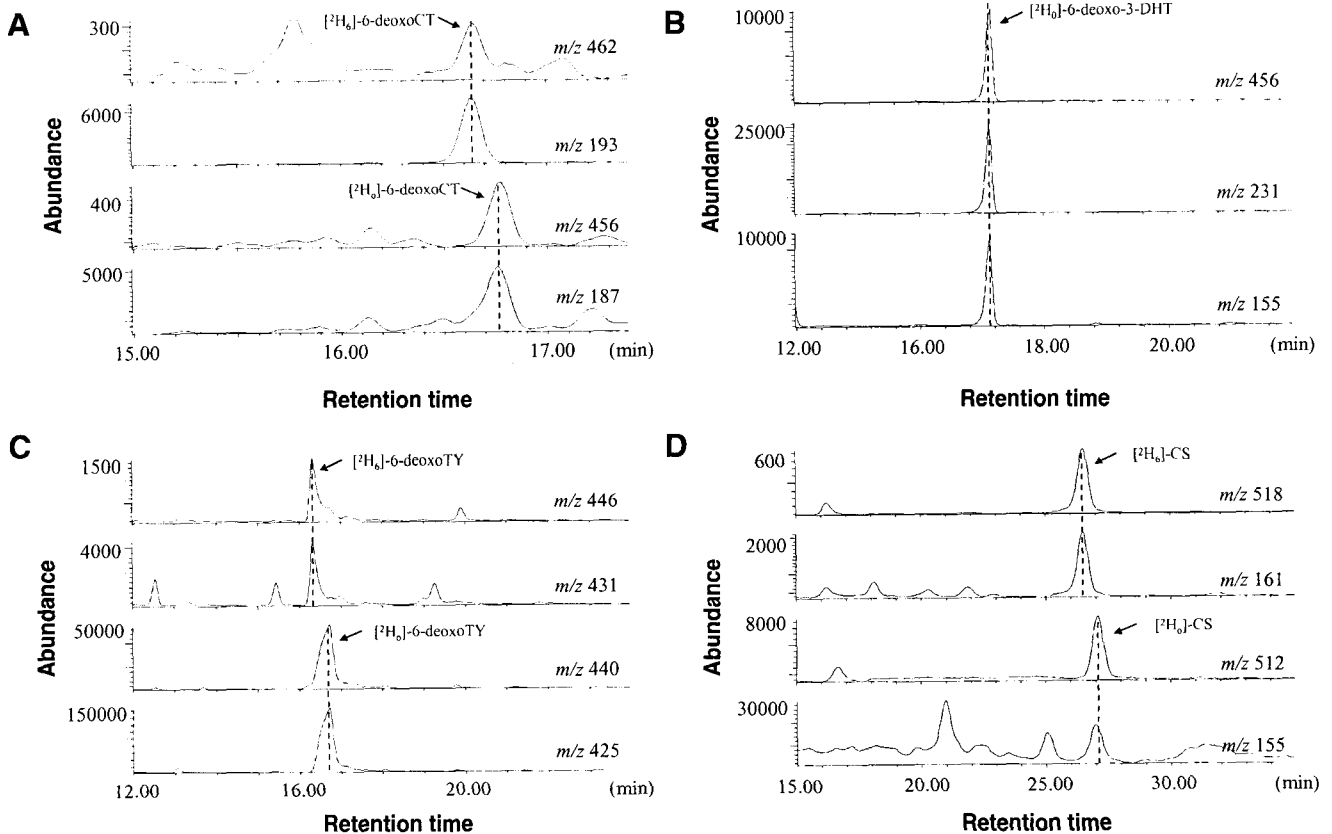


Figure 2. GC-SIM analysis of enzyme products for campestanol (CN) 22(R)-hydroxylase (A), 6-deoxoteasterone (6-deoxoTE) dehydrogenase (B), 6-deoxo-3-dehydroteasterone (6-deoxo-3-DHT) reductase (C), and 6-deoxocasterone (6-deoxoCS) oxidase (D) in shoots of maize.

reduction 반응으로, 이 반응은 reductase에 의해 촉매되어진다. 식물체의 6-deoxoTE dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase는 cytosolic 효소로 알려져 있다 (Park et al. 1999). 이에 옥수수 유식물 줄기로부터 cytosolic 효소원을 조제한 후, 기질로 [$^2\text{H}_6$]-6-deoxoTE 5 μg 을 처리한 후에 30분간 효소반응을 측정하였다. 반응이 끝난 후, 50 ng의 [$^2\text{H}_6$]-deoxoTY를 표준물질로 첨가하여 정제한 후에, 생성물로서 여겨지는 6-deoxo-3-DHT는 MB 유도체로서, 6-deoxoTY는 MB-TMSi 유도체로서 GC-SIM에 의해 분석하였다. 그 결과 [$^2\text{H}_6$]-6-deoxo-3-DHT MB 유도체의 분자량 ion peak인 m/z 456과 특징적인 ion peak인 m/z 231과 155가 합성 [$^2\text{H}_6$]-6-deoxo-3-DHT MB의 GC Rt와 동일한 시간에서 검출되었고, [$^2\text{H}_6$]-6-deoxoTY MB-TMSi 유도체의 특징적인 peak인 m/z 440, 425, 그리고 155 peak가 합성 [$^2\text{H}_6$]-6-deoxoTY MB-TMSi 유도체와 같은 GC Rt에서 확인되었다. 따라서 조제한 6-deoxoTE dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase에 의하여 6-deoxo-3-DHT와 6-deoxoTY로 전환되었음을 확인하여, 옥수수 유식물 줄기 내에 6-deoxoTE dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase가 존재함을 확인하였다 (Figure 2B, 2C).

6-DeoxoCS oxidase의 활성

6-deoxoCS에서 CS으로의 전환은 6-deoxoCS의 C6-deoxodihydro구조가 산화됨에 따라 CS의 6-ketone 구조로 변하는 반응으로 microsomal 효소에 의한 반응으로 알려져 있다 (Bishop et al. 1999; Kim et al. 2003). 이에 microsomal 효소원에 5 μg 의 [$^2\text{H}_6$]-6-deoxoCS를 기질로 사용하여, 30분간 효소반응을 하였다. 반응이 끝난 후, 50 ng의 [$^2\text{H}_6$]-CS을 표준물질로 첨가하여 정제한 후에, BMB 유도체로 GC-SIM 분석을 하였다. 그 결과 [$^2\text{H}_6$]-CS BMB 유도체의 분자량 peak인 m/z 512와 base peak인 155가 [$^2\text{H}_6$]-CS BMB 유래의 ion peak인 m/z 518 (M^+)와 161 (base peak)과 함께 검출되었으며, [$^2\text{H}_6$]-CS BMB는 GC Rt에서 합성 [$^2\text{H}_6$]-CS BMB와 일치하였다. 즉, 옥수수 유식물 줄기내의 6-deoxoCS oxidase에 의해 6-deoxoCS가 CS로 전환됨을 확인할 수 있었다 (Figure 2D).

BL synthase의 활성

옥수수의 여러 품종과 조직들을 이용한 실험에서 아직까지 BL의 동정이 이루어진 예가 없다 (Kim et al. 2000; Gamoh et al. 1990; Sekimoto et al. 1997; Suzuki et al. 1986). 본 실험에서는 BL의 전구물질로 생각되는 CS는 동정되었지만 BL의 동정은 이루어지지 못하였다. 이는 옥수수에서는 BL이 생합성의 최종산물이 아니고 CS가 생합성의 최종산물일 가능성을 제시하는 것으로, 이를 좀더 구체적으로 확인하고자 CS에서 BL로의 전환을 촉매하는 BL synthase의 효소 활성이 옥수수 유식물 줄기에서 결핍되어 있는지를 확인하고자 하였다.

CS에서 BL로의 변환은 Baeyer-Villiger 반응에 의하여 (Donoghue et al. 1976; Fraaije et al. 2002), CS의 6-oxo group이 BL의 7-oxa-lactone 구조로 전환됨에 의해 일어난다. 이 변환은 생체 내에 존재하는 microsomal BL synthase에 의해 촉매되어지므로 (Kim et al. 2003), microsomal 효소원에 5 μg 의 [$^2\text{H}_6$]-CS을 기질로 하여, 30분간 효소 반응한 후, 50 ng의 [$^2\text{H}_6$]-BL을 표준물질로 첨가하여 정제한 후에, BMB 유도체로 GC-SIM 분석을 하였다. 그 결과 표준물질인 [$^2\text{H}_6$]-BL BMB의 분자량 ion peak인 m/z 534, 338, 그리고 161 등은 검출되었지만, [$^2\text{H}_6$]-BL BMB의 분자량 ion peak (m/z 528) 및 base peak (m/z 155)는 검출되지 않았다 (Figure 3). 따라서 옥수수 줄기 내 BL synthase의 활성은 찾을 수 없었으며, 옥수수 줄기 내에서는 BL이 아닌 CS가 활성형 BR로 작용하고 있다고 사료되었다 (Figure 4).

본 연구에서는 식물 줄기 내 BRs의 생합성을 연구하기 위하여 다량의 옥수수 유식물 줄기를 재료로 이용하여 BRs의 생합성 전구물질과 내생 BRs의 동정을 시도하였다. 그 결과 BRs의 생합성 전구물질로서 CR과 CN이 동정되었고, 내생 BRs로서는 후기 C6 산화과정에 포함되는 CS와 deoxoCS이 각각 0.23 ng/g fr wt, 3.8 ng/g fr wt로 정량되어 동정되었으나, 초기 C6 산화과정에 속하는 TE, TY는 전혀 검출되지 않았다. 이 결과에 의하면 옥수수 줄기 내 BRs는 후기 C6 산화과정에 의해서 일어나고 있다고 사료되었다. 그러나 이들 화합물들이 종자 내에서부터 이동하여 온 것일 수 있는 가능성을 배제할 수는 없었다. 이에 이들 화합물들이 옥수수 유식물 줄기에서부터 생합성되었는지의 여부를 확인하기 위하여 후기 C6 산화과정에 관여하는 효소의 활성이 옥수수 유식물 줄기 내에 존재하는지 확인하고자 하였다. 이에 옥수수 유식물 줄기에서 BRs의 생합성 전구물질을 동정하고 효소원을 조제하여 효소의 활성을 확인하였다. 그 결과 CN 6-deoxoCT의 전환을 촉매하는 CN 22(R)-hydroxylase, 6-deoxoTE \rightarrow 6-deoxo-3-DHT \rightarrow 6-deoxoTY의 C3 epimerization을 촉매하는 6-deoxoTE

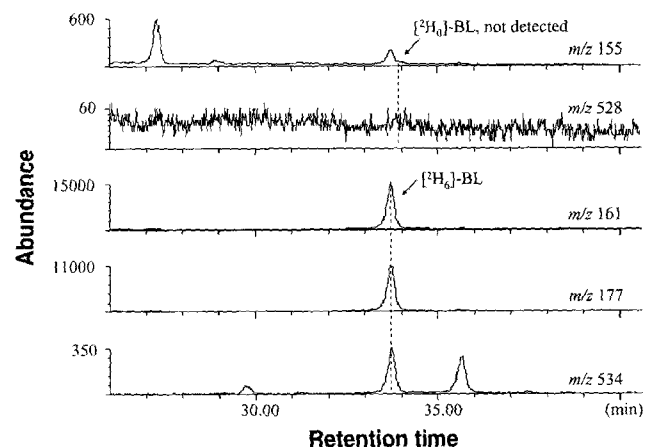


Figure 3. GC-SIM analysis of enzyme products for brassinolide (BL) synthase in shoots of maize.

dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase 및 6-deoxoCS → CS를 촉매하는 6-deoxoCS oxidase의 활성이 옥수수 줄기 내에 각각 존재함을 알 수 있었다. 이는 표준 BRs가 없어 아직 6-deoxoCT → 6-deoxoTE를 촉매하는 6-deoxoCT 23- α -hydroxylase 및 6-deoxoTY → 6-deoxoCS를 촉매하는 6-deoxoTY 2 α -hydroxylase의 확인은 이루어지지 못하였으나, 옥수수 유식물 줄기에는 후기 C6 산화과정에 관여하는 모든 효소가 존재할

것으로 사료되는 결과로서 옥수수 유식물 줄기내의 BRs는 종자에서부터 발아시 이동하여 온 것이 아니고 유식물 그 자체에서 생합성된 것으로 사료된다. 이 결과는 식물의 발달과정에서 조직 자체가 스스로 BRs를 생합성하며 사용하고 있음을 처음으로 밝힌 중요한 결과라 할 수 있다.

식물의 종에 따라 활성형 BR이 서로 다를 가능성은 여러 식물들의 내생 BRs의 분석을 통하여 대두되어왔다 (Fujioka 1999; Kim 1991). 특히 옥수수에 있어서는 여러 품종 및 기관들을 분석하였음에도 불구하고, CS는 동정되었으나 BL이 동정되지 않고 있어 옥수수의 활성형 BR은 BL이 아니고 CS일 가능성이 제기되었다. 그러나 내생 BR의 동정에서 이용되는 GC-MS의 분석 시, BL의 최소 검출량이 CS에 비하여 수분의 일에 불과하고, CS에서 BL로의 전환은 limiting step의 하나로서 생각되어져 확실히 CS가 활성형 BR인지를 결론 내리기는 어려웠다. 본 실험에서는 이를 확인하기 위하여 CS에서 BL로의 변환을 촉매하는 BL synthase의 존재를 옥수수 유식물 줄기 내에서 조사하였으나, 검출되지 않았으며, 이는 옥수수 유식물 줄기에서는 BRs 생합성의 최종산물은 BL이 아니고 CS임을 증명한 최초의 결과로 받아들여질 수 있다고 사료되어진다.

비록 일일초, 우산이끼 그리고 애기장대 식물을 통한 실험에서 CS가 BL로 전환 될 수 있음이 확인되었으나 (Kim et al. 2003; Noguchi et al. 2000; Suzuki et al. 1993), 몇몇 CS를 다량 함유하고 있는 식물들의 경우, BL이 전혀 검출되지 않고 있으며 (Fujioka 1999; Yokota 1997), CS로부터 BL로의 전환이 확인된 식물체들의 경우에 있어서도 그 전환율은 극히 낮아 (Noguchi et al. 2000; Sakurai 1999; Suzuki et al. 1995) CS가 BL의 직접적인 생합성 전구물질로서만 역할을 할 것인가에 대해서는 논란의 여지가 많다. 특히, 비록 BL보다는 고 농도를 필요로 하나, BL의 외부처리에 의하여 유도되는 모든 생리 현상들은 CS의 외부처리에 의해서도 유도되며 (Kim et al. 2000), BRs 결핍 돌연변이체의 경우, BL 뿐만 아니라 CS의 처리에 의해서도 야생형으로 회복된다 (Yamamoto et al. 2001). 그리고, 최근 BRs의 신호 전달에 있어 BRs의 수용체로 알려진 BRI1과의 결합 시험에 있어서도 BL의 약 5~7배 정도의 농도를 필요로 하나 CS 역시 BRI1과의 결합 활성을 나타내고 있음이 밝혀져 있어 (Wang et al. 2001), 일반적으로 CS의 생체

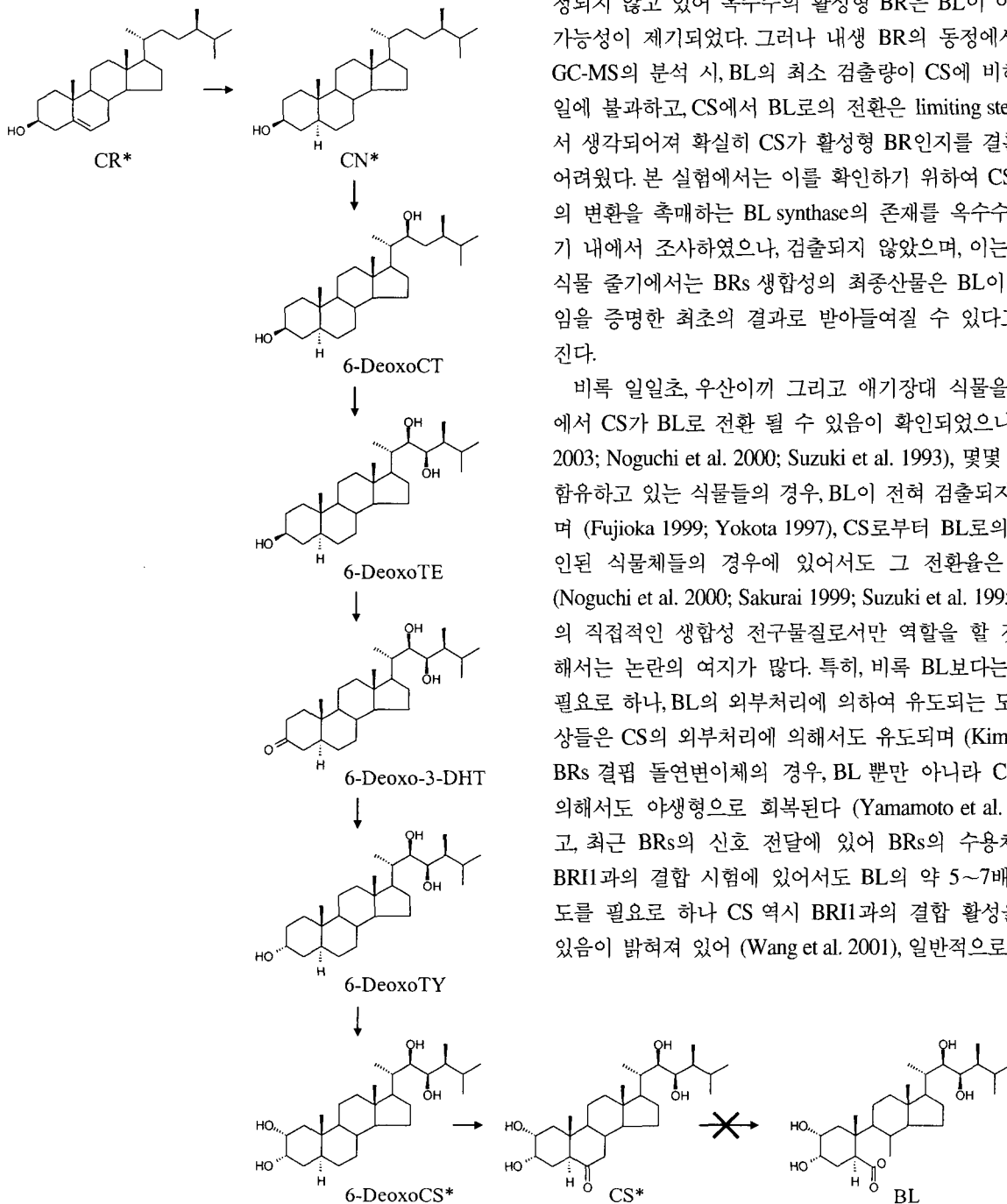


Figure 4. The late C6-oxidation pathway to produce brassinosteroids (BRs) possibly involved in maize shoots. Asterisks indicate steroids identified from maize shoots. CR; campesterol, CN; campestanol, 6-deoxoCT; 6-deoxocathasterone, 6-deoxoTE; 6-deoxoteasterone, 6-deoxo-3-DHT; 6-deoxo-3-dehydroteasterone, 6-deoxoTY; 6-deoxytyphasterol, 6-deoxoCS; 6-deoxocastasterone, CS; castasterone, BL; brassinolide.

농도는 BL의 생체 농도보다 수 배에서 수십 배 정도 높음을 감안할 때 CS 자신이 활성형 BR로서 BRs의 생리 활성을 나타낼 수 있음을 제안하고 있다. 이런 점을 감안 할 때 옥수수 뿌리에서 BRs 생합성의 최종산물로 확인된 CS는 옥수수 유식물의 성장과 분화에 있어 활성형 BR로서 중요한 역할을 할 수 있으리라 생각된다. 그러나 향후 더욱 정확한 결과를 위해서는 CS에서 BL로의 전환을 촉매하는 BL synthase 유전자의 동정이 이루어지고, 옥수수 유식물 줄기 내 BL synthase 유전자 발현 결핍이 확인되며, BL synthase의 결핍에 의해서도 옥수수 유식물의 표현형이 야생형의 표현형과 크게 다르지 않음 등을 확인하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

GC-MS/SIM를 통하여 옥수수 유식물 신초로부터 6-deoxocasterone (CS)과 6-deoxocasterone (6-deoxoCS)을 동정하였다. 또한 BRs의 생합성 전구물질인 24 α -methylcholesterol과 24 α -methylcholestanol이 동정하였다. 이들 BRs와 생합성 전구물질은 BRs의 생합성과정 중 후기 C6 산화과정에 속하는 화합물로서, 옥수수 유식물 줄기에서는 BRs의 생합성 과정으로 후기 C6 산화과정이 주된 생합성 과정임을 알 수 있었다. 다음으로 옥수수 유식물 줄기내의 BRs가 발아와 더불어 종자에서부터 이동해 온 것인지, 아니면 줄기 성장 시 줄기 자체가 생합성된 것인지를 조사하기 위하여 몇몇 중요한 후기 C6 산화과정의 반응을 촉매하는 효소의 활성이 유식물 줄기에 존재하는지를 조사하였다. 그 결과 후기 C6 산화과정에 포함되는 24 α -methylcholestanol에서 6-deoxocasterone (6-deoxoCT), 6-deoxoteasterone (6-deoxoTE)에서 6-deoxo-3-dehydroteasterone (6-deoxo-3-DHT)을 거쳐 6-deoxyphasterol (6-deoxyTY), 그리고 6-deoxoCS에서 CS로의 과정을 촉매하는 24 α -methylcholestanol 22(R)-hydroxylase, 6-deoxoTE dehydrogenase/6-deoxo-3-DHT reductase, 6-deoxoCS oxidase의 활성이 옥수수 유식물 줄기에 존재하고 있음이 확인되었다. 이는 유식물 줄기 성장 시 필요한 BRs가 발아종자로부터 이동되는 것이 아니라, 유식물 줄기 자체에서 생합성 될 가능성이 높음을 나타내는 결과라 할 수 있다. 또한 옥수수 유식물 줄기에서 CS를 brassinolide (BL)로 전환하는 BL synthase의 활성이 검출되지 않아, 옥수수 유식물 줄기에서의 활성형 BR은 BL이 아닌 CS임을 밝혔다.

사사 - 본 연구는 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

인용문헌

Abe H, Takatsuto S, Nakayama M, Yokota T (1995) 28-homoty-

- phasterol, a new natural brassinosteroid from rice (*Oryza sativa*) bran. *Biosci Biotech Biochem* 59: 176-178
- Adam G, Petzold U (1994) Brassinosteroids: a new phytohormone group. *Naturwissenschaften* 81: 210-217
- Arima M, Yokota T, Takahashi N (1984) Identification and quantification of brassinolide-related steroids in the insect gall and healthy tissue of the chestnut plant. *Phytochemistry* 23: 1587-1592
- Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA (1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10: 219-230
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JDG, Kamiya Y (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1761-1776
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- 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 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 10: 231-243
- Choi YH, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A (1997) An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. *Phytochemistry* 44: 609-613
- Chory J, Catterjee M, Cook R (1996) From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12066-12071
- Clouse SD, Feldmann KA (1999) Molecular genetics of brassinosteroids action. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, eds, *Brassinosteroids*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 163-190
- Donoghue NA, Norris DB, Trudgill PW (1976) The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardia globerula* CL1 and *Acinetobacter*. *NCIB 9871*. *Eur J Biochem* 63: 175-192
- Fraaije MW, Kamerbeek NM, van Berkel WJH and Janssen DB (2002) Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Lett* 518: 43-47
- Fujioka S (1999) Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, eds, *Brassinosteroids*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 21-45
- Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, Yanagisawa T, Yokota T, Sakurai A (1995) Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Cathamatus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1543-1547
- Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, Sakurai A (1997) The *Arabidopsis deetiolated2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 9: 1951-1962
- Fujioka S, Sakurai A (1997) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol Plant* 100: 710-715
- Gamoh K, Okamoto N, Takasuto S, Tejima I (1990) Determination of traces of natural brassinosteroids as dansylaminophenyl-

- boronates by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal Chim Acta* 228: 101-105
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD Jr, Steffen GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC Jr (1979) Brassinolide, a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216-217
- Kim SH, Chang SC, Lee EJ, Chung WS, Kim YS, Hwang S, Lee JS (2000) Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. *Plant Physiol* 123: 997-1004
- Kim SK (1991) Natural occurrences of brassinosteroids. In: Cutler HG, Yokota T, Adam G, eds, *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Application*, ACS Symposium Series 474. Amer Chem Soc, Washington DC, pp 26-35
- Kim YS, Kim TW, Kim SK (2003) Conversion of 6-deoxocasterone to brassinolide in a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Bull Korean Chem Soc* 24: 1385-1388
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398-401
- Marquardt V, Adam G (1991) Recent advances in brassinosteroid research. In: Boerner H, Martin D, Sjut V, eds, *chemistry of Plant Protection, Vol 7: Herbicide Resistance-Brassinosteroids, Gibberellins, Plant Growth Regulators*. Springer-Verlag, Berlin, pp 103-139
- Meudt WJ (1987) Chemical and biological aspects of brassinolide. In: Fuller G, Nes WD, eds, *Ecology and Metabolism of Plant Lipids*. ACS Symp Ser 325, Amer Chem Soc, Washington DC, pp 53-75
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA (2000) Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 201-209
- Nomura T, Nakayama M, Reid JB, Takeuchi Y, Yokota T (1997) Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea. *Plant Physiol* 113: 31-37
- Park SH, Han KS, Kim TW, Shim JK, Takatsuto S, Yokota T, Kim SK (1999) In vivo and in vitro conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* 40: 955-960
- Richter K, Koolman J (1991) Antiecdysteroid effects of brassinosteroids in insects. In: Cutler HG, Yokota T, Adam G, eds, *Brassinosteroids; Chemistry, Bioactivity and Application*, ACS Symp Ser 474, Amer Chem Soc, Washington DC, pp 265-279
- Sakurai A (1999) Biosynthesis. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, eds, *Brassinosteroids; Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 137-161
- Sakurai A, Fujioka S (1993) The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids. *Plant Growth Regul* 13: 147-159
- Sakurai A, Fujioka S (1997) Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci Biotech Biochem* 61: 757-762
- Sasse JM (1991) Brassinosteroids-induced elongation. In: Culter HG, Yokota T, Adam G, eds, *Brassinosteroids; Chemistry, Bioactivity and Application*, ACS Symp Ser 474, Amer Chem Soc, Washington DC, pp 255-264
- Sekimoto H, Hoshi M, Nomura T, Yokota T (1997) Zinc deficiency affects the levels of endogenous gibberellins in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol* 38: 1087-1090
- Suzuki Y, Yamaguchi I, Takahashi N (1985) Identification of castasterone and brassinolide from immature seeds of *Pharbitis purpurea*. *Agric Biol Chem* 49: 49-54
- Suzuki Y, Yamaguchi I, Yokota T, Takahashi N (1986) Identification of castasterone, typhasterol and teasterone from the pollen of *Zea mays*. *Agric Biol Chem* 50: 3133-3188
- Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Murofushi N, Sakurai A (1993) Biosynthesis of brassinolide from castasterone in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Plant Growth Regul* 12: 101-106
- Suzuki H, Inoue T, fujioka S, Saito T, Takatsuto S, Yokota T, Murofushi N, Yanagisawa T, Sakurai A (1995) Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 40: 1391-1397
- 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 CYP 90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85: 171-182
- Takahashi T, Gasch A, Nishizawa N, Chua NH (1995) The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes Dev* 9: 97-107
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410: 380-383
- Yamamoto R, Fujioka S, Demura T, Takatsuto S, Yoshida S, Fukada H (2001) Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. *Plant Physiol* 125: 556-563
- Yokota T (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Elsevier Trends Journals* 2: 137-143
- Yokota T, Watanabe S, Ogino Y, Yamaguchi I, Takahashi N (1990) Radioimmunoassay for brassinosteroids and its use for comparative analysis of brassinosteroids in stems and seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J Plant Growth Regul* 9: 151-159