

# 옥수수 유식물 싹에서 Brassinosteroids의 항상성 조절을 위한 C-26 탈메틸 반응의 중요성

박현희, 김영수, 김성기\*  
중앙대학교 생명과학과

## Importance of C-26 Demethylation for Homeostatic Regulation of Brassinosteroids in Seedling Shoots of *Zea mays* L.

Hyun-Hee Park, Young-Soo Kim, Seong-Ki Kim\*

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

**ABSTRACT** Regulatory mechanism for endogenous levels of castasterone (CS) and its biosynthetic precursors in shoots of maize was investigated by the use of enzyme solution prepared from the plant tissue. When [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]- and [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS was used as substrates, [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-26-norCS and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norCS were identified as products, indicating that [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]- and [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS are differently metabolized into [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-26-norCS and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norCS by C-26 and C-28 demethylation, respectively. This suggests that both C-26 and C-28 demethylation can be involved in CS catabolism. In fact that C-28 demethylation only occurred when isotope labeled substrate was used, however, C-26 demethylation is thought to be a natural reaction occurred in the maize shoots. When 6-deoxoteasterone (6-deoxoTE) was used, 6-deoxo-26-norTE and 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE as well as 6-deoxo-3-dehydroTE and 6-deoxyphasterol (6-deoxoTY) were identified as enzyme products. When 6-deoxoTY was added, 6-deoxo-26-norTY as well as 6-deoxo-3-dehydroTE and 6-deoxoTE was identified as products. These indicate that C-26 demethylation of 6-deoxoTE, 6-deoxo-3-dehydroTE and 6-deoxoTY as well as a reversible C-3 epimerization from 6-deoxoTE to 6-deoxoTY intermediated by 6-deoxo-3-dehydroTE are operative in the maize shoots, demonstrating that endogenous levels of biosynthetic precursors of CS are also controlled by C-26 demethylation. Therefore, it is thought that C-26 demethylation is an important and a common deactivation process which functions to maintain steady state levels of endogenous brassinosteroids in the maize shoots.

**Key words:** Biodegradation, enzymatic conversion, maize

### 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-5 $\alpha$ -cholestane-6-one으로 밝혀졌으며 (Grove et al. 1979), BL과 그 관련 화합물을 brassinosteroid류 (BRs)로 총칭하며 하등 녹조류에서 종자식물에 이르기까지 식물계 전반

에 걸쳐 약 40여 종이 폭 넓게 분포하고 있음이 보고 되었다 (Grove et al. 1979; Fujioka 1999; 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 보고 되었다 (Adam 1994; Chory et al. 1996; Marquardt et al. 1991; Meudt 1987; Sakurai and Fujioka 1993; Sasse 1991; 1997). 또한, 최근에 애기장대 (*Arabidopsis*), 토마토, 그리고 완두 등에서 BR-결핍 돌연변이체들 (BR-deficient mutants)이 발견

\*Corresponding author Tel 02-820-5210 Fax 02-820-5206

E-mail: skkimbio@cau.ac.kr

되었으며, 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; Szekeres et al. 1996).

천연의 BRs는 C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> 스테로이드로서 5 $\alpha$ -cholestane의 탄소 골격을 기본으로 C-24 위치에 존재하는 alkyl기의 종류에 따라 구분되고, 이 중에서 C24-methyl 형의 C<sub>28</sub>-BRs가 식물체 내에 가장 넓게 분포하고 있으며, 이 중 BL이 가장 강한 생리활성을 나타낸다 (Fujioka 1999; Yokota 1997). 식물체 내에서의 C24-methyl BRs의 생합성 과정은 isotope을 표식한 중간대사 산물의 feeding 실험 (Yokota et al. 1990; Suzuki 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 $\alpha$ -methylcholesterol (campesterol, CR)을 전구체로 하여 24 $\alpha$ -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 (Choi et al. 1997; Suzuki et al. 1995). 최근에 토마토에서 C<sub>27</sub> BRs인 6-deoxo-28-norcastasterone (6-deoxo-28-norCT), 6-deoxo-28-nortyphasterol (6-deoxo-28-norTY), 6-deoxo-28-norcastasterone (6-deoxo-28-norCS), 28-norCS 등이 동정되었으며 (Yokota et al. 2001), 이들의 구조적 특징과 동일한 탄소골격을 갖는 cholesterol (CHR)이 cholestanol (CHN)으로 전환된다는 보고와 함께 (Nakajima et al. 2002), 최근 토마토를 이용한 효소 변환 실험을 통해 C<sub>28</sub> BRs와 동일한 생합성 반응을 통해 CHR에서 6-deoxo-28-nor형의 BRs를 경유하여 28-norCS로 생합성 되어지는 것이 확인되었다. 또한 C<sub>27</sub> BRs의 최종산물인 28-norCS에서 C-24 메틸 반응에 의하여 C<sub>28</sub> BRs인 CS로 전환됨이 확인되어 (Kim et al. 2004a), C<sub>27</sub> BRs의 생합성 과정이 활성형 C<sub>28</sub> BR의 생체 농도 조절을 위한 중요한 생합성 과정으로 증명되었다.

BRs의 생합성과 함께 이화작용은 내생 BRs의 함량을 조절하는 중요한 인자이다 (Yokota 1999). 토마토 세포에서 불활성 과정으로 C-26 수산화 반응이 제안되었으며 (Winter et al. 1997), 애기장대에서 *bas1-D phyB-4* 돌연변이체의 연구를 통하여 BL의 C-26 수산화 반응은 cytochrome P450 효소인 CYP72B1에 의하여 촉매됨이 밝혀졌다 (Neff et al.

1999). 우산이끼의 현탁 배양세포에서 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-BL은 26번의 탄소가 제거된 26-norBL로 전환되는 반면 중수소로 치환된 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-BL은 28번의 탄소가 제거된 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norBL로 전환됨이 밝혀졌다 (Kim et al. 2000a).

이처럼 몇몇 연구결과가 발표되었지만 아직까지 BRs의 이화작용에 대해서는 상당히 미흡한 상태이다. 이에 본 연구에서는 본 연구실에 의하여 BRs의 생합성 과정이 밝혀진 옥수수 유식물 줄기를 대상으로 활성형 BR인 CS와 그 중요 생합성 전구물질의 생분해 과정을 동 식물체로부터 얻어진 효소원을 이용한 *in vitro* 효소변환 실험을 통해 조사하고자 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 옥수수 유식물 줄기를 사용하였다.

### 효소원의 조제

효소원 조제의 모든 과정은 4°C를 유지하면서 수행하였으며, 옥수수 유식물 줄기(30 g)를 해사와 혼합한 뒤, 2배 부피의 cold homogenization buffer를 사용하여 cold pestle과 mortar로 파쇄하였다. 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, 상정액은 cold acetone (최종 농도 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 효소원으로 사용하였다. 조제된 효소원의 단백질 양은 Bradford 방법으로 정량하였다 (Bradford 1976).

### 효소반응 및 대사산물의 분석

CS, 6-deoxoTE 그리고 6-deoxoTY demethylase에 의한 표준 assay mixture는 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer

(pH 7.4)에 현탁된 5 mg protein의 crude enzyme solution에 95% EtOH에 녹인 기질인 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS, [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-CS, -6-deoxoTE, 그리고 -6-deoxoTY를 각각 5 µg과 증류수에 녹인 4.8 mM NADPH를 넣어 total 1.2 mL volume으로 구성하였다. 모든 assay는 두 번씩 행하였다. 배양은 NADPH의 첨가에 의해 개시하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 30분 후 1.2 mL의 water-saturated EtOAc를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 28-norCS, [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-BR [6-deoxo-3-dehydroTE (6-deoxo-3-DHT), 6-deoxoTY, 6-deoxoTE]을 각각 50 ng씩을 효소 반응액에 각각 첨가하여, gas chromatography-selected ion monitoring (GC-SIM) 분석시 정량 분석을 위한 표준물질로서 사용하고자 하였다.

1.2 mL의 EtOAc 첨가에 의해 배양이 종료된 EtOAc와 buffer 혼합액을 vortex 후 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상정액인 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 mL과 100% MeOH 5 mL을 차례로 흘려주었으며, 이 때의 100% MeOH 분획만을 수집하여 농축·건조하였다.

Sep-Pak C18 cartridge column을 통하여 얻어진 CS demethylase의 효소 반응 대사산물은 역상 HPLC column (Novapak C18, 8 × 100 mm)을 이용하여 정제를 하였으며, 용출 용매로는 40% acetonitrile (MeCN) 용액을 분당 1 mL의 유속으로 일정하게 흘려주었으며, 6-deoxoTE, 6-deoxoTY demethylase의 효소반응 대사산물은 역상 HPLC column (Senshu Pak, Pegasil-B ODS, 10 × 150 mm)을 사용하였으며, 용출 용매는 45% MeCN 용액을 일정하게 20 분간 흘려주었으며, 40분까지 100% MeCN으로 농도구배를 주어, 분당 2.5 mL의 유속으로 흘려주었다. HPLC 후 얻어진 활성 분획은 GC-SIM으로 분석하기 위해 bismethanboronate (BMB)체화 하거나, methanboronate-trimethylsilylate (MB-TMSi) ether체 화하였다. 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 µm 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.

#### 생물활성 시험

BRs의 활성을 검출하기 위한 rice lamina inclination (RLI)

bioassay는 벼 (*Oryza sativa* var., Koshihikari) 종자를 사용하여 Arima 등 (1984)의 방법으로 행하였다

## 결과 및 고찰

### CS의 대사

옥수수 유식물 줄기내 활성형 BR로서 CS의 demethylase에 의한 생분해를 알아보기 위하여 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS, [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-CS를 이용하여 *in vitro* 효소변환 실험을 수행하였다. 먼저 5 mg 단백질 효소원에 기질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-CS와 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS를 각각 5 µg을 넣고, 각각에 4.8 mM NADPH를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1.2 mL water-saturated EtOAc를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 표준물질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS를 기질로 사용한 시험관에 28-norCS 50 ng을 넣고 EtOAc로 추출한 다음 Sep-Pak C18과 역상 HPLC를 통해 정제한 후, 예상되는 효소산물이 용출되는 분획 (#11-13)에 대하여 GC-SIM으로 최종 분석하였다.

우선 예상되는 반응산물인 26-norCS와 28-norCS의 GC-MS 분석을 표준물질을 이용하여 행하였다. 그 결과 26-norCS와 28-norCS의 BMB체는 모두 분자량 ion peak인 *m/z* 498과 base peak인 *m/z* 141을 비롯하여 주요 ion peak 들인 *m/z* 483, 441, 357, 327, 287등이 나타나 mass spectrum에 있어서는 구별되지 못하였다. 그러나 GC의 retention time (Rt)에 있어 26-norCS BMB체는 10.670분, 28-norCS BMB체는 10.310분에 나타나 GC 상에서 확실히 분리됨을 확인하였다 (Table 1).

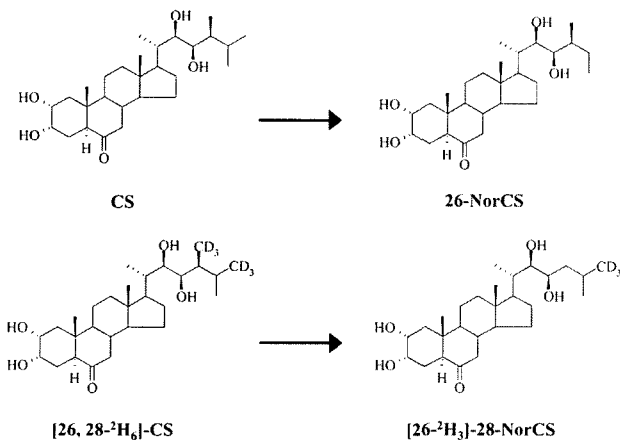
다음으로 HPLC 후 얻어진 반응산물의 분획 (#11-13)을 BMB체화 하여 GC-SIM으로 분석한 결과, 기질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-CS를 사용한 반응산물은 표준물질 26-norCS의 BMB체와 동일한 GC-Rt (10.670분)에서 특징적인 ion peak인 *m/z* 498, 483, 441, 357, 327, 287, 141을 확인하였으며, 이와는 달리 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS를 사용한 반응산물은 표준물질 28-norCS의 BMB체의 GC-Rt (10.310분) 보다 0.430분 늦은 10.740분에서 28-norCS의 BMB체보다 분자량 3이 증가된 *m/z* 501과 144를 포함한 *m/z* 486, 441, 357, 327, 287이 확인되어 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norCS임을 확인하였다 (Table 1). 이러한 결과는 우산이끼의 현탁 배양세포에서 [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-BL은 26번의 탄소가 제거된 26-norBL로 전환되는 반면 중수소로 치환된 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-BL은 28번의 탄소가 제거된 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norBL로 전환되는 결과와 일치하는 것으로, C-26 탈메틸 반응에 의해 천연에 존재하지 않은 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS에서 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norCS로의 전환은 인위적인 반응이며, C-26 탈메틸 반응에 의한 [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-CS에서 26-norCS로의 전환이 실제 식물체에서 일어나는 반응으로 사료되었다 (Figure 1). 이와 함께

**Table 1.** GC-MS/SIM data for authentic BRs and CS and [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS metabolite in maize seedling shoots

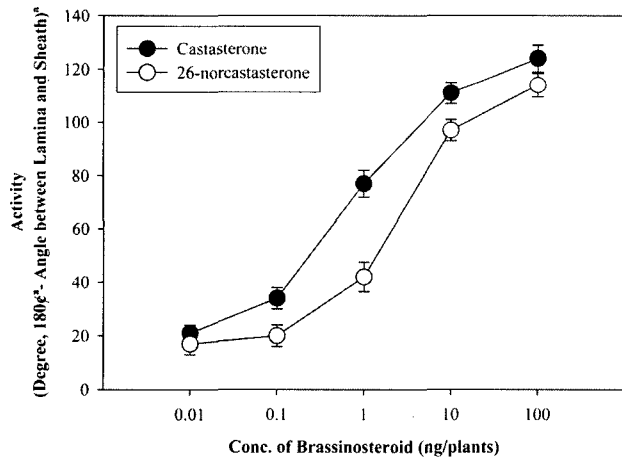
Compound	Rt <sup>a</sup> on HPLC	Rt on GC	Prominent ions (m/z, relative intensity %)
Authentic 26-norCS <sup>b</sup>	11-13	10.670	498 (M <sup>+</sup> , 74), 483 (5), 441 (7), 357 (14), 327 (11), 287 (42), 141 (100)
Authentic 28-norCS <sup>b</sup>	11-13	10.310	498 (M <sup>+</sup> , 52), 483 (8), 441 (5), 357 (16), 327 (11), 287 (66), 141 (100)
CS metabolite <sup>b</sup>	11-13	10.670	498 (M <sup>+</sup> , 60), 483 (9), 441 (3), 357 (10), 327 (8), 287 (30), 141 (100)
[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-CS metabolite <sup>b</sup>	11-13	10.740	501 (M <sup>+</sup> , 43), 486 (9), 441 (4), 357 (12), 327 (9), 287 (64), 144 (100)

<sup>a</sup> Retention time (min)

<sup>b</sup> The sample was analyzed as a derivative of bismethaneboronate.



**Figure 1.** Differential catabolism of [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]- and [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS in maize seedling shoots.



**Figure 2.** RLI bioassay test of CS and 26-norCS.

26-norCS가 CS의 생분해 물질인지 아니면 더 높은 활성을 나타내는 활성형 BR인지를 알아보기 위하여 CS와 26-norCS의 생리활성을 RLI bioassay를 통하여 조사하였다. 그 결과 26-norCS는 동일한 농도조건 (0.01-100 ng/plants)에서 CS보다 평균 21%의 낮은 활성을 나타내어 26-norCS는 CS보다 생합성의 활성형 BR이 아닌 CS의 생분해 산물임을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

### 6-deoxoTE의 대사

본 연구에 의하여 확인된 CS의 생분해 과정인 C-26 탈메틸 반응은 우산이끼와 강낭콩의 배양세포를 이용한 BL의 생분해 과정에서 확인된 반응과 같은 반응으로서 CS와 BL이 C-26 탈메틸 반응에 의하여 활성을 상실하는 반응이 존재한다는 것은 CS와 BL의 생합성 과정 중 생합성 중간물질에 있어서도 C-26 탈메틸 반응에 의해 과다 생산된 생합성 중간물질들에 있어서도 생합성에 참여하지 못하고 C-26 탈메틸 반응이 일어날 가능성이 있다고 사료되었다. 이에 옥수수 유식물 줄기에서 CS의 후기 C6 산화과정의 생합성 전구물질로 확인된 6-deoxoTE와 6-deoxoTY를 대상으로 C-26 탈메틸 반응을 조사하였다.

6-DeoxoTE의 C-26 탈메틸 반응에 의한 생분해를 알아보기 위하여 *in vitro* 효소변환 실험을 수행하였다. 먼저 5 mg 단백질 효소원에 기질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-6-deoxoTE 5 μg 과 4.8 mM NADPH를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1.2 mL water-saturated EtOAc를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 표준물질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-6-deoxo-3-DHT와 -6-deoxoTY 그리고 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-6-deoxo-28-norTE를 각각 50 ng을 첨가하였다. 이후 EtOAc로 추출한 다음 Sep-Pak C18과 역상 HPLC를 통해 정제하였다. HPLC 후 얻어진 반응산물 중 6-deoxo-3-DHT (#50), 6-deoxoTY (#54-55), 6-deoxo-26-norTE (#44), 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE (#46-47)에 해당되는 분획들을 모아 MB체 하거나 또는 MB-TMSi ether체화 하여 GC-SIM으로 최종 분석하였다.

이미 생합성 과정이 알려진 6-deoxoTE에서 6-deoxo-3-DHT를 거쳐 6-deoxoTY로의 변환은 C3 epimerization 반응으로, 표준물질 6-deoxo-3-DHT (#50)와 6-deoxoTY (#54-55)의 해당되는 HPLC 분획을 각각 MB 또는 MB-TMSi ether체화 하여 GC-SIM으로 분석하였다. 표준물질 6-deoxo-3-DHT (#50)에 해당되는 HPLC 분획 (6-deoxoTE metabolite I)을 MB체화 하여 GC-SIM으로 분석한 결과, 6-deoxo-3-DHT MB체의 분자량 ion peak인 m/z 456과 base peak로서 m/z 231을 비롯하여 주요 ion peak들인 m/z 385, 301, 246, 155를 포함하는 mass spectrum이 표준물질 6-deoxo-3-DHT MB체와 동일한 GC-Rt (17.860분)에서 나타났으며, 또한 표준물질 6-deoxoTY (#54-55)의 해당되는

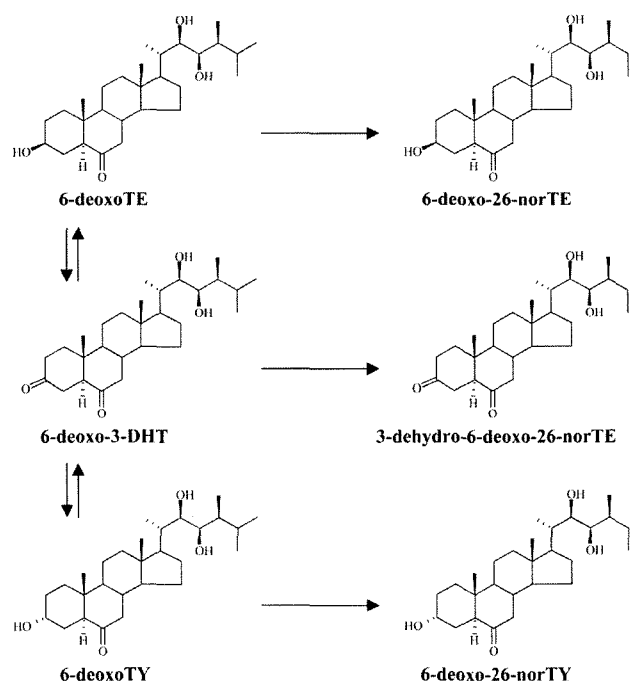
**Table 2.** GC-MS/SIM data for authentic BRs and 6-deoxoTE metabolite in maize seedling shoots

Compound	Rt <sup>a</sup> on HPLC	Rt on GC	Prominent ions (m/z, relative intensity %)
Authentic 6-deoxo-3-DHT <sup>b</sup>	50	17.860	456 (M <sup>+</sup> , 63), 385 (8), 301 (21), 246 (23), 231 (100), 155 (60)
Authentic 6-deoxoTY <sup>c</sup>	54-55	15.212	530 (M <sup>+</sup> , 23), 515 (4), 440 (48), 425 (49), 305 (12), 230 (21), 215 (100), 155 (29)
Authentic 6-deoxo-28-norTE <sup>c</sup>	44	15.682	516 (M <sup>+</sup> , 70), 501 (65), 459 (25), 426 (23), 305 (35), 230 (26), 215 (100), 141 (20)
Authentic 3-dehydro-6-deoxo-28-norTE <sup>b</sup>	46-47	17.011	442 (M <sup>+</sup> , 72), 427 (12), 246 (11), 231 (100), 217 (24), 163 (23), 141 (26)
6-deoxoTE metabolite I <sup>b</sup>	50	17.860	456 (M <sup>+</sup> , 64), 385 (8), 301 (24), 246 (23), 231 (100), 155 (64)
6-deoxoTE metabolite II <sup>c</sup>	54-55	15.212	530 (M <sup>+</sup> , 23), 515 (5), 440 (31), 425 (29), 305 (17), 230 (34), 215 (100), 155 (29)
6-deoxoTE metabolite III <sup>b</sup>	44	16.190	516 (M <sup>+</sup> , 73), 501 (65), 459 (25), 426 (23), 305 (38), 230 (26), 215 (100), 141 (21)
6-deoxoTE metabolite IV <sup>c</sup>	46-47	17.712	442 (M <sup>+</sup> , 73), 427 (10), 246 (10), 231 (100), 217 (24), 163 (23), 141 (26)

<sup>a</sup> Retention time (min)

<sup>b</sup> The sample was analyzed as a derivative of methanaboronate (MB).

<sup>c</sup> The sample was analyzed as a derivative of MB-trimethylsilylic (TMSi) ether.



**Figure 3.** Metabolism of 6-deoxoTE and 6-deoxoTY in maize seedling shoots.

HPLC 분획 (6-deoxoTE metabolite II)을 MB-TMSi ether 체화하여 GC-SIM으로 분석한 결과, 6-deoxoTY MB-TMSi ether체의 분자량 ion peak인  $m/z$  530과 base peak로서  $m/z$  215를 비롯하여 주요 ion peak들인  $m/z$  515, 473, 440, 425, 305, 230, 155를 포함하는 mass spectrum이 표준물질 6-deoxoTY MB-TMSi ether체와 동일한 GC-Rt (15.212분)에서 나타나 6-deoxoTE dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase에 의한 생합성 경로가 존재함을 재확인 하였다 (Table 2).

표준물질 6-deoxo-28-norTE (#44)의 해당되는 HPLC 분획 (6-deoxoTE metabolite III)을 MB-TMSi ether체화하여 GC-SIM으로 분석한 결과, 예상되는 6-deoxo-26-norTE

MB-TMSi체의 분자량 ion peak인  $m/z$  516을 비롯하여 501, 459, 426, 305, 230, 215, 141의 mass spectrum이 표준물질 6-deoxo-28-norTE MB-TMSi체의 GC Rt (15.682분)보다 0.508분 늦은 16.190분에 관찰되었다. 또한 표준물질 3-dehydro-6-deoxo-28-norTE (#46-47)의 해당되는 HPLC 분획 (6-deoxoTE metabolite IV)을 MB체화하여 GC-SIM 분석결과, 예상되는 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE MB체의 분자량 ion peak인  $m/z$  442를 비롯하여 427, 246, 231, 217, 163, 141의 mass spectrum이 표준물질 3-dehydro-6-deoxo-28-norTE MB체의 GC Rt (17.010분)보다 0.702분 늦은 17.712분에 관찰되었다 (Table 2). 이러한 결과는 C-26 탈메틸 반응의 반응산물이 C-28 탈메틸 반응의 반응산물보다 GC-Rt가 0.42-0.72분 정도 늦게 나타난다는 사실과 표준물질 6-deoxo-28-norTE MB-TMSi체와 3-dehydro-6-deoxo-28-norTE MB체의 주요 ion들의 상대적 강도가 각각 반응산물들과 동일하게 나타나는 것으로 보아 이 반응산물들이 6-deoxoTE의 C-26 탈메틸 반응에 의한 6-deoxo-26-norTE와 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE일 가능성이 높다고 사료되었다 (Figure 3). 향후 6-deoxo-26-norTE와 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE가 합성된다면 이를 표준물질로 사용하면 보다 정확히 밝혀질 것으로 사료된다.

### 6-deoxoTY의 대사

후기 C6 산화과정에서 CS의 생합성 전구물질로 알려진 6-deoxoTY의 C-26 탈메틸 반응에 의한 생분해를 알아보기 위하여 *in vitro* 효소변환 실험을 수행하였다. 5 mg 단백질 효소원에 기질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-6-deoxoTY 5  $\mu$ g과 4.8 mM NADPH를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1.2 mL water-saturated EtOAc를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 표준물질로서 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-6-deoxo-3-DHT와 -6-deoxoTE 그리고 [C26, 28-<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-6-deoxo-28-norTY를 각각 50 ng을 첨가하였다. 이후 EtOAc로 추출한 다음 Sep-Pak C18과 역상 HPLC를 통해 정제하였다.

**Table 3.** GC-MS/SIM data for authentic BRs and 6-deoxyTY metabolite in maize seedling shoots

Compound	Rt <sup>a</sup> on HPLC	Rt on GC	Prominent ions (m/z, relative intensity %)
Authentic 6-deoxo-3-DHT <sup>b</sup>	50	17.860	456 (M <sup>+</sup> , 63), 385 (8), 301 (21), 246 (23), 231 (100), 155 (60)
Authentic 6-deoxoTE <sup>c</sup>	48	17.802	530 (M <sup>+</sup> , 49), 515 (44), 473 (17), 440 (17), 305 (28), 230 (26), 215 (100), 155 (41)
Authentic 6-deoxo-28-norTY <sup>c</sup>	49-50	13.398	516 (M <sup>+</sup> , 23), 501 (6), 459 (4), 426 (62), 305 (11), 230 (35), 215 (100), 141 (15)
6-deoxyTY metabolite I <sup>b</sup>	50	17.860	456 (M <sup>+</sup> , 64), 385 (8), 301 (24), 246 (23), 231 (100), 155 (64)
6-deoxyTY metabolite II <sup>c</sup>	48	17.802	530 (M <sup>+</sup> , 44), 515 (41), 473 (22), 440 (23), 305 (31), 230 (26), 215 (100), 155 (38)
6-deoxyTY metabolite III <sup>c</sup>	49-50	13.789	516 (M <sup>+</sup> , 21), 501 (9), 459 (4), 426 (62), 305 (11), 230 (30), 215 (100), 141 (15)

<sup>a</sup> Retention time (min)

<sup>b</sup> The sample was analyzed as a derivative of methanboronate (MB).

<sup>c</sup> The sample was analyzed as a derivative of MB-trimethylsilylic (TMSi) ether.

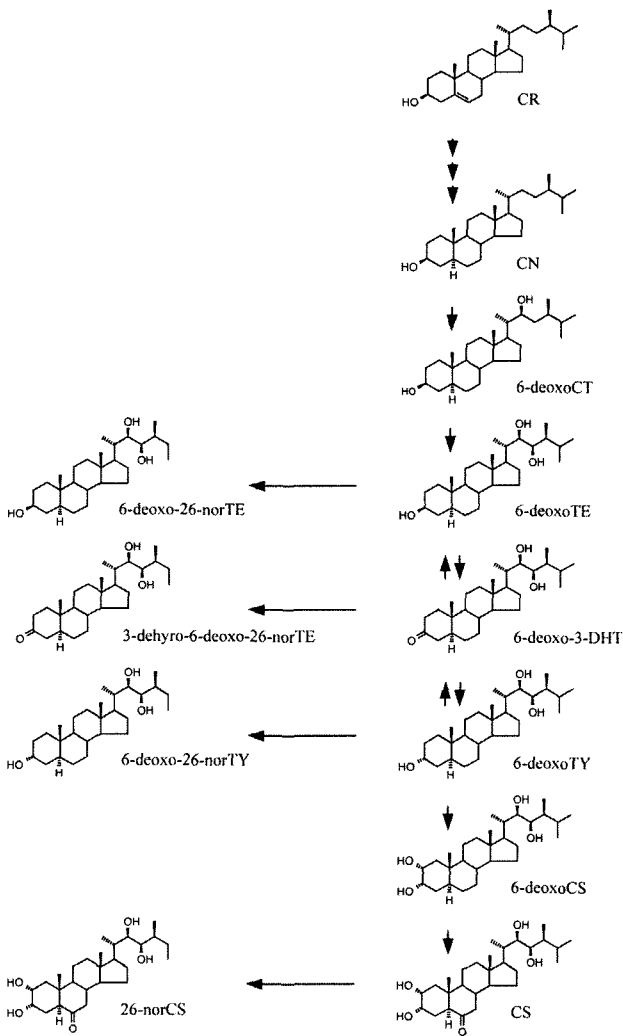
먼저 BRs의 생합성 과정에서 6-deoxyTY은 6-deoxo-3-DHT를 거쳐 6-deoxoTE로의 변환이 C3 epimerization 반응에 의한 역반응 과정이 알려져 있어 이를 확인하고자, 표준물질 6-deoxo-3-DHT (#50)와 6-deoxoTE (#48)의 해당되는 HPLC 분획을 각각 MB 또는 MB-TMSi ether체화 하여 GC-SIM으로 분석하였다. 표준물질 6-deoxo-3-DHT (#50)에 해당되는 HPLC 분획 (6-deoxyTY metabolite I)을 MB체화하여 GC-SIM으로 분석한 결과, 6-deoxo-3-DHT MB체의 분자량 ion peak인  $m/z$  456과 base peak로서  $m/z$  231을 비롯하여 주요 ion peak들인  $m/z$  385, 301, 246, 155를 포함하는 mass spectrum이 표준물질 6-deoxo-3-DHT MB체와 동일한 GC-Rt (17.860분)에서 나타났으며, 또한 표준물질 6-deoxoTE (#48)의 해당되는 HPLC 분획 (6-deoxoTE metabolite II)을 MB-TMSi ether체화하여 GC-SIM으로 분석한 결과, 6-deoxoTE MB-TMSi ether체의 분자량 ion peak인  $m/z$  530과 base peak로서  $m/z$  215를 비롯하여 주요 ion peak들인  $m/z$  515, 473, 440, 305, 230, 155를 포함하는 mass spectrum이 표준물질 6-deoxoTE MB-TMSi ether체와 동일한 GC-Rt (17.802분)에서 나타나 6-deoxyTY dehydrogenase와 6-deoxo-3-DHT reductase에 의한 생합성 경로가 존재함을 재확인 하였다 (Table 3).

표준물질 6-deoxo-28-norTY (#49-50)의 해당되는 HPLC 분획 (6-deoxyTY metabolite III)을 MB-TMSi ether체화하여 GC-SIM 분석결과, 예상되는 6-deoxo-26-norTY MB-TMSi체의 분자량 ion peak인  $m/z$  516을 비롯하여 501, 459, 426, 305, 230, 215, 141의 mass spectrum이 표준물질 6-deoxo-28-norTY MB-TMSi체의 GC-Rt (13.398분)보다 0.391분 늦은 13.789분에 관찰되었다. 또한 표준물질 6-deoxo-28-norTY MB-TMSi체의 주요 ion들의 상대적 강도가 반응산물과 동일하게 나타나 이 반응산물은 6-deoxyTY의 C-26 탈메틸 반응에 의한 6-deoxo-26-norTY일 가능성이 높다고 사료되었다 (Table 3 and Figure 3).

식물의 종에 따라 활성형 BR이 서로 다를 가능성은 여러 식물들의 내생 BRs의 분석을 통해 대두되어왔다 (Fujioka

1999; Kim 1991). 특히 옥수수에 있어서는 여러 품종 및 기관들을 분석하였음도 불구하고 CS는 동정되었으나 BL이 동정되지 않았으며, 또한 CS에서 BL로의 변환을 촉매하는 BL synthase의 활성이 검출되지 않고 있어 옥수수의 활성형 BR은 BL이 아니고 CS일 것으로 사료된다 (Kang et al. 2003; Kim et al. 2000b; 2004b; Suzuki et al. 1986). 비록 일일초, 우산이끼 그리고 애기장대 식물을 통한 실험에서 CS가 BL로 전환될 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), BL의 외부 처리에 의하여 유도되는 모든 생리 현상들은 CS의 외부 처리에 의해서도 유도되며 (Kim et al. 2000b), BRs 결핍 돌연변이체의 경우, BL 뿐만 아니라 CS의 처리에 의해서도 야생형으로 회복된다 (Yamamoto et al. 2001). 또한 BRs의 신호전달에 있어 BRs의 수용체로 알려진 BRII과의 결합 시험에 있어서도 CS 또한 BRII과의 결합 활성을 나타내고 있음이 밝혀져 있다 (Wang et al. 2001). 즉 식물체 내에서는 CS는 단순히 BL의 생합성 전구물질 뿐만 아니라 그 자체가 활성형 BR로서 BR의 생리활성을 나타낼 가능성이 높다고 사료되어진다.

CS이 생체 내에서 활성형 BR이라면 CS의 적정함량 기작이 생체 내에 존재하여야 한다. 현재까지 BR의 생합성은 생합성의 최종산물이 생합성 전단계의 효소활성을 되먹임 작용이 알려져 있다. 특히 CS와 BL은 모두 BR의 C22 산화 반응을 촉매하는 CPD 단백질의 발현을 조절함이 알려져 있다 (Mathur et al. 1998). 그러나 생체함량 조절기작을 위해서는 생합성에 의한 합성의 조절과 함께, 활성을 나타낸 BR의 생분해에 의한 함량조절이 중요하리라 사료되었다. 이에 본 연구에서는 CS의 생분해 과정을 *in vitro* 효소변환을 통해 조사한 결과, CS는 C-26 탈메틸 반응에 의해 26-norCS로 전환되어 활성이 상실됨을 처음으로 밝힐 수 있었다. 이미 BL의 C-26 탈메틸 반응은 우산이끼와 강낭콩의 배양세포에서 확인된 반응으로 활성형 BR로서 알



**Figure 4.** The late C6-oxidation pathway to produce BRs and metabolism of BRs possibly involved in maize seedling shoots.

려진 CS와 BL 모두가 C-26 탈메틸 반응이 일어난다는 것은 C-26 탈메틸 반응이 생체 내 BRs의 함량조절에 중요하다는 것을 나타내는 것이라 하겠다.

옥수수 줄기로부터 CS의 생합성 전구물질인 CR, CN, 6-deoxoCS가 동정되었는데, 이들은 모두 CS의 생합성 과정 중 하나인 후기 C6 산화과정에 속한 화합물로서 옥수수 줄기에서 CS는 후기 C6 산화과정에 의해 생합성 될 가능성이 대두되었다. 이전의 연구를 통해 옥수수 줄기로부터 효소원을 조제하여 효소변환 실험에 의하여 그 가능성을 확인한 결과, CR → CN → 6-deoxoCT → 6-deoxoTE → 6-deoxo-3-DHT → 6-deoxoTY → 6-deoxoCS → CS의 변환이 확인되어 옥수수 유식물 줄기에는 후기 C6 산화과정이 작동하고 있음을 확인하였다 (Kang et al. 2003). 이에 본 연구에서는 후기 C6 산화과정의 주요 중간 대사물질인 6-deoxoTE와 6-deoxoTY를 기질로 하여 조제된 효소원을 이용한 *in vitro* 효소변환 실험을 수행한 결과 6-deoxoTE는

6-deoxo-3-DHT를 경유하여 6-deoxoTY로 전환될 뿐만 아니라 6-deoxoTE는 6-deoxo-26-norTE, 6-deoxo-3-DHT는 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE로 전환되며, 6-deoxoTY는 6-deoxo-26-norTY로 전환됨이 확인되었다. 이는 C-26 탈메틸 반응이 CS나 BL뿐만 아니라 이들의 생합성 전구물질에서도 일어나고 있음을 나타내는 것으로, C-26 탈메틸 반응은 다수의 BRs에서 탈활성화를 위해 일어나는 중요한 반응임을 알 수 있었다 (Figure 4).

일반적으로 탈메틸 반응은 수산화, 알데히드 그리고 탄산기를 거쳐 이산화탄소의 형태로 제거된다고 알려져 있다. BRs의 경우 C26-hydroxyBL이 동정되어 BRs도 상기의 반응을 거쳐 탈메틸 반응이 일어나리라 생각되어지고 있다. 이러한 가능성을 보다 확실히 밝히기 위해서는 향후 BRs의 C-26에 알데히드나 탄산기를 포함하고 있는 천연 BRs의 동정이 필요하다고 사료된다.

## 적 요

옥수수 유식물 줄기에서 중요 BRs의 함량조절 기작을 옥수수 유식물 줄기로부터 얻어진 효소원을 이용하여 조사하였다. 먼저 활성형 BR인 CS의 대사를 [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-와 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS를 기질로 사용하여 실험한 결과 [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-와 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS는 각각 [<sup>2</sup>H<sub>0</sub>]-26-norCS와 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-28-norCS로 전환됨을 GC-MS 분석을 통해 확인하였으며, 이러한 두 가지의 대사과정 중 C-26 탈메틸 반응에 의한 CS에서 26-norCS로의 전환만이 생체 내에서 일어나는 반응임을 확인하였다. 이와 함께 주요 생합성 전구물질인 6-deoxoTE와 6-deoxoTY에 대해서도 같은 효소원을 이용하여 C-26 탈메틸 반응에 의한 대사를 조사한 결과 6-deoxoTE는 6-deoxo-3-dehydroTE와 6-deoxoTY로, 6-deoxoTY는 6-deoxo-3-dehydroTE와 6-deoxoTE로 전환됨을 확인함과 동시에, 6-deoxoTE는 6-deoxo-26-norTE로, 6-deoxo-3-DHT는 3-dehydro-6-deoxo-26-norTE, 6-deoxoTY는 6-deoxo-26-norTY로 전환됨을 확인하였다. 이러한 결과들은 옥수수 유식물 줄기에서 중요 BRs가 모두 C-26 탈메틸 반응이 일어날 수 있음을 나타내는 결과로서 BRs의 C-26 탈메틸 반응이 활성형 BR뿐만 아니라 그 생합성 전구물질에도 중요한 함량조절 기작임을 확인 할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 2005년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

## 인용문헌

- 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 chesnut 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  $\alpha$ -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
- 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, 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
- 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
- Kang MW, Kim YS, Kim SK (2003) Identification and biosynthetic pathway of brassinosteroids in seedling shoots of *Zea mays* L.. *Korean journal of Plant Biotechnology* 30:411-419
- Kim SK, 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 TW, Chang SC, Choo J, Watanabe T, Takatsuto S, Yokota T, Lee JS, Kim SY, Kim SK (2000a) Brassinolide and [26, 28-2H6]brassinolide are differently demethylated by loss of C-26 and C-28, respectively, in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* 42:1171-1174
- Kim TW, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Yokota T, Kim SK (2004b) Novel biosynthetic pathway of castasterone from cholesterol in tomato. *Plant Physiology* 135: 1231-1242
- Kim TW, Chung WS, Kim YS, Kim SK (2004b) 6-Deoxocastasterone and its biosynthetic precursors from primary roots of maize. *Bull Korean Chem Soc* 25: 1099-1102
- Kim YS, Kim TW, Kim SK (2003) Conversion of 6-deoxocastasterone to brassinolide in a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Bull Korean Chem Soc* 24:1385-1388
- 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
- Mathur J, Molnár G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yokota T, Adam G, Voigt B, Nagy F, Maas C, et al. (1998) Transcription of the *Arabidopsis* CPD gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* 14:593-602
- 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
- Nakajima N, Fujioka S, Tanaka T, Takatsuto S, Yoshida S (2002) Biosynthesis of cholesterol in higher plants. *Phytochemistry* 60:275-279
- Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Sete H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, Chory J (1999) *BAS1*: a gene regulation brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15316-15323
- 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
- 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, 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
- Winter J, Schneider B, Strack D, Adam G (1997) Role of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in the hydroxylation of 24-epi-brassinolide. *Phytochemistry* 45:233-237
- 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 (1999) Brassinosteroids. In: Hooykaas MA, Hall MA, Libbenga KR (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science, Amsterdam pp. 277-293
- Yokota T, Sato T, Takeuchi Y, Nomura T, Uno K, Watanabe T, Takatsuto S (2001) Roots and shoots of tomato produce 6-deoxo-28-norcastasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone. *Phytochemistry* 58:233-238
- 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

(접수일자 2006년 1월 20일, 수리일자 2006년 2월 21일)

