

## 벼 유식물을 이용한 C<sub>29</sub>-Brassinosteroids의 대사

원소윤, 주세환, 김성기  
중앙대학교 생명과학과

### Metabolic Study on C<sub>29</sub>-Brassinosteroids in Young Rice Plants

So Yun Won, Se-Hwan Joo, and Seong-Ki Kim\*

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

**ABSTRACT** It has been recently demonstrated the presence of not only C<sub>28</sub>-BRs biosynthesis, but also C<sub>27</sub>- and C<sub>29</sub>-BRs biosynthesis in plants, suggesting that BRs biosynthesis are complicatedly connected to produce biologically active BR (s). This prompted us to investigation of metabolism of a C<sub>29</sub>-BR, 28-homoCS in seedlings of rice from which C<sub>29</sub>-BRs such as 28-homoTE and 28-homoTY have been identified. In vitro enzyme conversion study using a crude enzyme solution prepared from rice seedlings revealed that 28-homoCS is converted into both CS and 26-nor-28-homoCS, but their reversed reaction did not occur. This indicated that 28-homoCS is biosynthetically converted into more biologically active C<sub>28</sub>-BR, CS by C-28 demethylation and biodegraded into 26-nor-28-homoCS by C-26 demethylation. Next, bio-conversion of 28-homoCS to 28-homoBL was examined by the same enzyme solution. No 28-homoBL as a metabolite of 28-homoCS was detected, meaning that biosynthetic reaction for 28-homoCS to 28-homoBL is not contained, and main connection of C<sub>28</sub>-BRs and C<sub>29</sub>-BRs biosynthesis is between CS and 28-homoCS in the rice seedling. This study is the first demonstrated that C<sub>29</sub>-BRs and C<sub>28</sub>-BRs biosynthetic pathways are connected, and that C<sub>29</sub>-BRs biosynthetic pathway is an alternative biosynthetic pathway to produce more biologically active C<sub>28</sub>-BR, CS in plant.

#### 서 론

Brassinosteroids (BRs)는 식물 유일의 스테로이드성 호르몬으로 다양한 식물의 성장과 분화를 조절한다. 현재까지 약 50 여종의 천연 BRS가 식물계로부터 동정되었는데, 이들은 24번 탄소의 alkyl기의 종류에 따라 C<sub>27</sub>-, C<sub>28</sub>- 및 C<sub>29</sub>-BRs로 분류되어진다. BRs의 식물체 내에서의 생합성 과정은 BRs의 내생 함량을 조절하는 가장 일차적인 요인

으로 여겨진다. 천연에 존재하는 BRs 생합성 과정에 관한 연구는 식물계에서 가장 폭넓게 분포하고 있고 가장 높은 활성을 나타내는 24-Methyl형인 C<sub>28</sub>-BRs를 중심으로 이루어져왔다 (Fujioka 1999, Yokota 1997). 생합성 연구초기에 labeling된 BRs의 순차적인 feeding 후 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)를 이용한 대사산물의 분석을 통해 BRs의 생합성 과정이 빠르게 확립되었다. 그 결과 C<sub>28</sub>-BRs의 생합성은 C<sub>28</sub>-BRs와 동일한 탄소 골격을 갖는 식물의 주요 sterol인 campesterol (CR)을 전구체로 하여 생합성 되는 것으로 알려졌는데, CR은 초기 생합성 과정을

\*Corresponding author Tel 02-820-5210 Fax 02-816-8134  
E-mail: skkimbio@cau.ac.kr

통해 campestanol (CN)로 전환된 후 CN의 C-6 oxidation 또는 22 (*R*)-hydroxylation을 통해 두 가지의 다른 경로, 즉 'The early C-6 oxidation pathway' 또는 'The late C-6 oxidation pathway'를 거쳐 castasterone (CS)를 합성하고, CS는 다시 brassinolide (BL)로 전환되는 것으로 알려졌다 (Bishop and Sakurai 1999; Yokota 2001; Yokota et al. 1997; Yokota 2000).

한편, 토마토 유식물에서 6-deoxo-28-norcathasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol, 6-deoxo-28-norCS, 28-norcastasterone (28-norCS)와 같은 다수의 C<sub>27</sub>-BRs가 동정되었던 결과 (Yokota et al. 2001)를 바탕으로 토마토 cell-free system과 yeast에서의 heterologous expression을 이용한 C<sub>27</sub>-BRs의 feeding 실험을 행하여 28-norCS를 합성하기 위한 C<sub>27</sub>-BRs의 생합성 경로가 식물체 내에 존재함을 처음으로 보고하였다 (Kim et al. 2004). 또한 이렇게 합성되었던 28-norCS는 다시 C-24 methylation을 통하여 CS로 전환될 수 있음을 확인하여 cholesterol (CHR)로부터 시작되는 C<sub>27</sub>-BRs의 생합성 경로 또한 활성형의 BR인 CS의 내생 함량을 증가시킬 수 있는 중요한 과정임을 증명하였다.

또한 강낭콩의 미성숙 종자에서 C<sub>27</sub>-BRs 생합성 경로의 cholesterol (CHR), cholestanol (CHN), 28-nortyphasterol, 28-norCS와 C<sub>28</sub>-BRs 생합성 경로의 CR, CN, typhasterol, castasterone의 counterpart인 C<sub>29</sub>-sterols인 sitosterol (STR), sitostanol (STN)과 C<sub>29</sub>-BRs인 28-homotyphasterol (28-homoTY), 28-homocastasterone (28-homoCS)가 존재함이 보고되어 식물체 내에 C<sub>27</sub>- 및 C<sub>28</sub>-BRs의 생합성 경로와 유사한 C<sub>29</sub>-BRs 생합성 경로가 존재할 가능성이 보고되었다 (Kim et al. 2006). 28-NorCS와 28-homoCS가 CS보다 활성이 약하고, 28-norCS가 CS로 생합성 된다는 결과 (Kim et al. 2004)를 고려 할 때, CS의 함량을 높이기 위한 C<sub>29</sub>-BRs에서 C<sub>28</sub>-BRs로의 생합성 과정도 존재할 가능성이 대두되었다. 즉 C<sub>27</sub>-BR인 28-norCS가 CS로 전환되는 것과 함께, C<sub>29</sub>-BRs의 28-homoCS가 CS로 전환되는 과정이 식물체 내에 존재할 가능성이 있다고 사료된다.

본 연구에서는 아직까지 알려지지 않은 C<sub>29</sub>-BR, 즉 28-homoCS 대사과정을 벼 유식물을 대상으로 효소원을 이용한 *in vitro* 효소변환 실험을 통해 조사함으로써 식물체 내에 C<sub>29</sub>-BRs의 생합성 과정이 C<sub>27</sub>-BRs 또는 C<sub>28</sub>-BRs의 생합성과 어떻게 연관되어 있으며, C<sub>29</sub>-BRs의 생합성 과정의 생리적 의미는 무엇인지를 조사하고자 하였다. 아울러, C<sub>29</sub>-BRs의 대사과정 연구를 통하여 C<sub>29</sub>-BRs는 어떻게 생체 내에서 그 함량을 조절하고 있는지를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료 및 생장 조건

벼 (*Oryza sativa* L. cv., Koshihikari)의 종자를 흐르는 물에 충분히 세척하여 2일간 28°C에서 수분을 흡수 시킨 후 발아 된 종자만을 골라 0.8% 한천배지에 심고 습도를 유지하며 압조건, 28°C에서 생육하였다. 생육기간 동안에는 매일 한 시간씩 적색광을 조사하였으며, 15일~20일 후 벼의 유식물의 뿌리를 포함한 식물체를 수확하여 사용하였다.

### 효소원 조제

효소원 조제의 모든 과정은 4°C 조건에서 수행하였으며, 수확 된 벼 유식물 (30 g)과 해사를 혼합한 뒤, 2배 volume의 cold homogenization buffer를 사용하여 cold pestle과 mortar로 homogenization 하였다. 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 4°C에서 15분간 원심분리 (Jouan SR 20.22) 한 후, 상층액만을 모아 다시 20,000 × g에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액은 cold acetone (final concentration 40%)을 첨가하여 -25°C에서 20분간 배양한 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 벼 유식물체의 효소원으로 사용하였다. 조제된 효소원 내의 단백질 양은 Bradford 방법으로 정량하였다 (Bradford 1976).

### 효소반응 및 대사산물의 정제

C<sub>29</sub>-BR의 demethylation 및 C<sub>29</sub>-BR로의 methylation 반응을 위한 표준 assay mixture는 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁 된 5 mg protein의 효소원에 95% EtOH에 녹인 기질인 5 μg CS, 28-homoCS와 D.W에 녹인 4.8 mM NADPH과 4.8 mM SAM을 각각 100 μl 넣어 total 1.2 mL volume으로 구성하였다. 모든 assay는 두 번씩 행하였다. CS에서 28-homoCS로의 methylation 효소반응은 NADPH와 SAM을 첨

가하고, 28-homoCS의 demethylation 효소반응은 NADPH와 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O첨가에 의해 개시되어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 30분 후 1.2 mL의 water-saturated ethyl acetate를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 100 ng의 [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-CS를 효소 반응액에 각각 첨가하여 gas chromatography-selected ion monitoring (GC-SIM) 분석 시 정량 분석을 위한 표준물질로서 사용하였다. 1.2 mL의 ethyl acetate 첨가에 의해 반응 종료된 ethyl acetate와 buffer mixture는 vortex후 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상층액인 ethyl acetate 층을 얻었으며, 동일한 방법으로 3회 반복 추출하여 얻은 ethyl acetate 층을 모아 감압농축 건조하였다. 감압농축 건조된 ethyl acetate 분획을 50% MeOH에 녹여 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge (Waters) column을 이용하여 분리 정제하였으며, 이 때, Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge는 H<sub>2</sub>O와 MeOH로 수 회 번갈아가며 conditioning 하였으며, 최종적으로 50% MeOH로 equilibrium시킨 후, 반응 산물의 용출은 50% MeOH 8 mL, 70% MeOH 8 mL, 100% MeOH 8 mL씩 차례로 흘려주었으며, 이때의 100% MeOH 분획만을 수집하여 농축·건조하였다.

Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge column을 통하여 얻어진 농축분을 역상 HPLC (Gilson 305 pump/805 manometric module/811C mixer) column (Senshu-pak ODS, 10  $\times$  150 mm)을 이용해 정제하였다. 이때 HPLC의 용출용매는 45% MeCN을 이용하여 1 mL/1 min의 유속으로 95분간 일정하게 흘려주었다. 각 분획들은 1분마다 수집하였으며, 파장 215 nm에서의 흡수 곡선으로 monitoring 하였다. 얻어진 분획들 중 동일조건 하에서 표준물질의 retention time (Rt)에 해당하는 분획들만을 모아 농축·건조하였다.

효소반응 산물의 분석

HPLC 후 얻어진 분획을 gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)로 분석하기 위해 bismethaneboronation (BMB)체화 하였다. BMB체의 함성은 20  $\mu$ g methaneboronic acid/10  $\mu$ L

pyridine을 시료에 25  $\mu$ L 첨가한 뒤, 70°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 산물의 분석을 위해 GC (HP 6890)-MS (HP 5973 : ionization voltage 70 eV)를 사용하였다. 이 때, GC column으로는 0.25 mm  $\times$  30 m, 0.25  $\mu$ m film thickness의 HP-5 (19030-433J, 5% PHME siloxane) column을 사용하였으며, 이 때 GC의 조건으로 on-column injection mode, carrier gas는 He 1 mL/min, inlet temperature는 280°C, oven temperature는 175°C에서 2분간 유지시킨 후, 280°C까지 매 분 40°C씩 상승시켜 280°C로 유지시켰다.

결 론

I. 28-HomoCS의 대사

벼 유식물로부터 조제한 효소원에 기질로 28-homoCS를 넣고 반응시킨 후 얻어진 28-homoCS의 대사 산물을 재료 및 방법에 서술한 것과 같이 정제하였다. Reversed phase HPLC 후 얻어진 분획 중 authentic CS를 같은 조건하에서 분석했을 때 얻어지는 37-39 분획을 수집하여 methaneboronation (MB) 시킨 후 GC-MS로 분석한 결과, GC Rt 30.10 min에서 분자량 ion peak *m/z* 512, base peak 155 이외에 *m/z* 358, 287 등의 ion peak가 검출되었다. 이는 authentic CS의 HPLC Rt와 CS-bismethaneboronate (BMB)의 GC Rt 및 이의 mass spectrum과 일치하는 것으로서 그 분획 내 metabolite (I)는 CS임을 확인할 수 있었다 (Table 1).

한편, HPLC 분획 40-42번에서도 Figure 1에서 나타난 것과 같이 GC-MS 분석 시 CS-BMB와 구별되지 않는 mass spectrum이 얻어졌으나, GC Rt (32.84 min)이 CS-BMB의 Rt (30.10 min)과는 상이하여 이 metabolite (II)는 구조적으로 CS와 유사하나 다른 구조를 갖고 있음을 예상하고, metabolite II의 mass fragmentation pattern을 CS-BMB와 비교 분석하였다 (Table 1, Figure 1). 그 결과 분자량 peak인 *m/z* 512, C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>

Table 1. GC-MS data for authentic CS, 28-homoCS metabolite I and II in young rice plant

| Compound                             | Rt <sup>a</sup> on HPLC | Rt on GC | Prominent ions ( <i>m/z</i> , relative intensity %)             |
|--------------------------------------|-------------------------|----------|---|
| Authentic CS <sup>b</sup>            | 37-39                   | 30.10    | 512, (M+, 60), 441 (5), 327 (8), 358 (10), 287 (60), 155 (100)  |
| 28-HomoCS metabolite I <sup>b</sup>  | 37-39                   | 30.10    | 512, (M+, 52), 441 (4), 327 (11), 358 (14), 287 (42), 155 (100) |
| 28-HomoCS metabolite II <sup>b</sup> | 40-42                   | 32.84    | 512, (M+ 74), 441 (7), 327 (11), 358 (16), 287 (66), 155 (100)  |

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

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

분열 peak  $m/z$  358, D-ring 분열 peak인  $m/z$  287, C22-C23 분열 peak  $m/z$  155등이 존재하는 것으로 볼 때 metabolite II의 구조는 C-23 골격까지는 CS와 동일하고 나머지 구조에서 demethylation 반응이 CS와 다르게 일어나는 것을 알 수 있었다.

이런 점을 감안할 때, 28-homoCS의 side chain 구조에서 demethylation 반응이 CS와 다르게 일어날 수 있는 곳은 C-26 위치뿐이므로 본 화합물은 26-nor-28-homoCS로 잠정적으로 구조결정 하였다.

### II. CS에서 28-homoCS로의 전환

28-HomoCS가 CS로 전환된다는 결과에 더하여 CS에서 28-homoCS로의 역반응이 일어나는지를 같은 벼 유식물로부터 조제한 효소원을 이용하여 조사하였다. HPLC를 통해 얻어진 분획들 중 동일 HPLC 조건하에서 authentic 26-norCS 또는 28-norCS에 해당하는 분획 (31-33)에 대해 BMB체화한 뒤 GC-MS를 통해 분석한 결과 Rt 27.67 min에서 26-norCS-BMB체의 spectrum을 확인할 수 있었으며, authentic CS와의 relative retention time을 비교한 결과 28-norCS보다 GC Rt가 늦음을 확인하여 대사산물은 26-norCS로 결정하였다. 이

는 몇몇 식물체에서 이미 알려진 것과 같이 CS가 벼 유식물 효소원에서 26-norCS로 전환 됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 동일 HPLC 조건하에서 authentic 28-homoCS가 용출되어 나오는 HPLC 분획 (fr. 42-44, GC Rt 35.35 min)에서는 28-homoCS-BMB체의 주요 ions인  $m/z$  526, 358, 287, 169등의 주요 peak들을 확인 할 수 없었다 (Figure 2). 이는 CS의 대사가 26-norCS을 통해 생분해가 되지만, methylation을 통해 28-homoCS으로는 전환되지 않음을 확인 할 수 있었다.

### III. 26-nor-28-homoCS에서 28-homoCS로의 전환과정

다음으로 26-nor-28-homoCS가 28-homoCS로 전환하는지를 조사하였다. 이에 28-homoCS의 대사산물인 metabolite II에 해당하는 HPLC 분획을 농축 건조하고, 이를 기질로 하여 D3-SAM과 NADPH를 첨가하여 rice에서 조제한 효소원으로 다시 assay를 행하였다. Reversed phase HPLC를 통해 얻어진 분획 중 authentic 28-homoCS Rt와 일치하는 분획 (42-44)을 수집하여 모아 농축 건조 한 후, BMB체화 한 뒤 GC-MS로 최종 분석 하였다. 그 결과 Figure 3에 나타나듯이 28-homoCS보다 3 mass 늘어난 D3-28-homoCS-BMB체의 ion

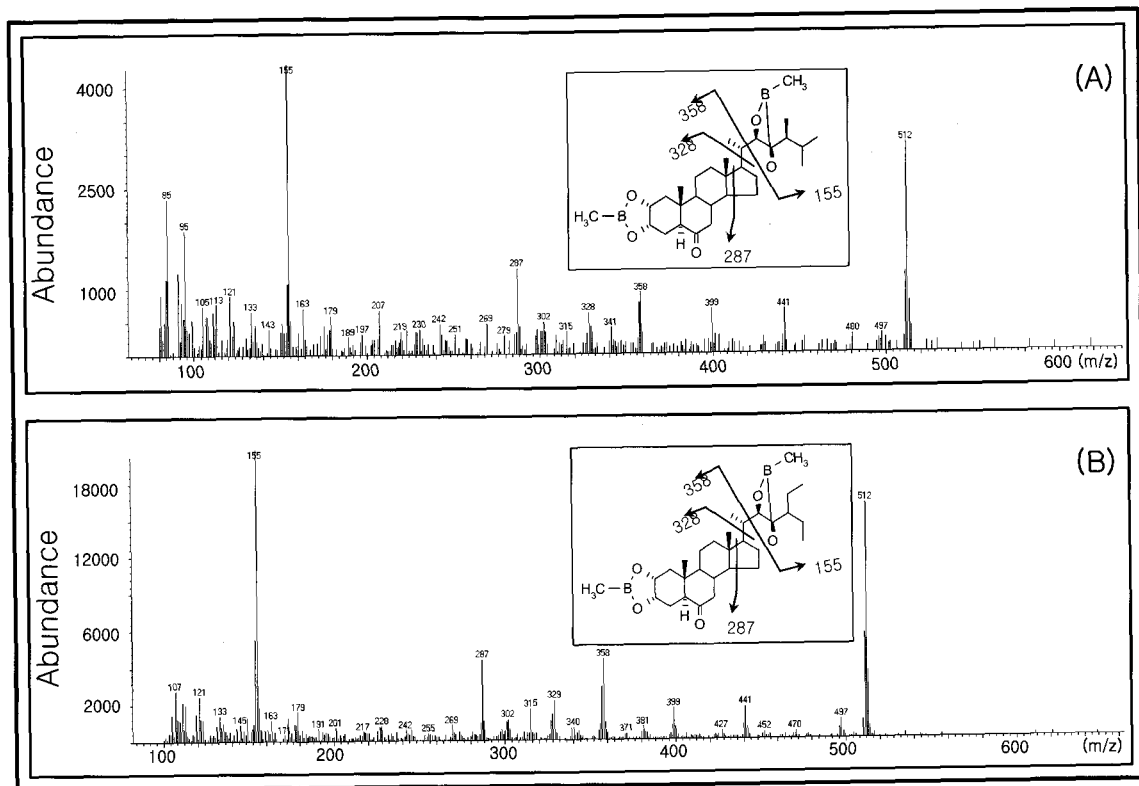


Figure 1. Mass fragmentation metabolite I (CS) (A) and metabolite II (26-nor-28-homoCS) (B).

인 *m/z* 529, 171, 358, 287 등의 주요 ion들이 나타나지 않았다. 즉, 26-nor-28-homoCS는 28-homoCS로 전환되지 않음을 확인 할 수 있었다.

IV. 28-homoCS에서 28-homoBL로의 전환과정

BR 6-oxidase활성을 갖는 CYP85A는 애기장대 (*CYP85A1*,

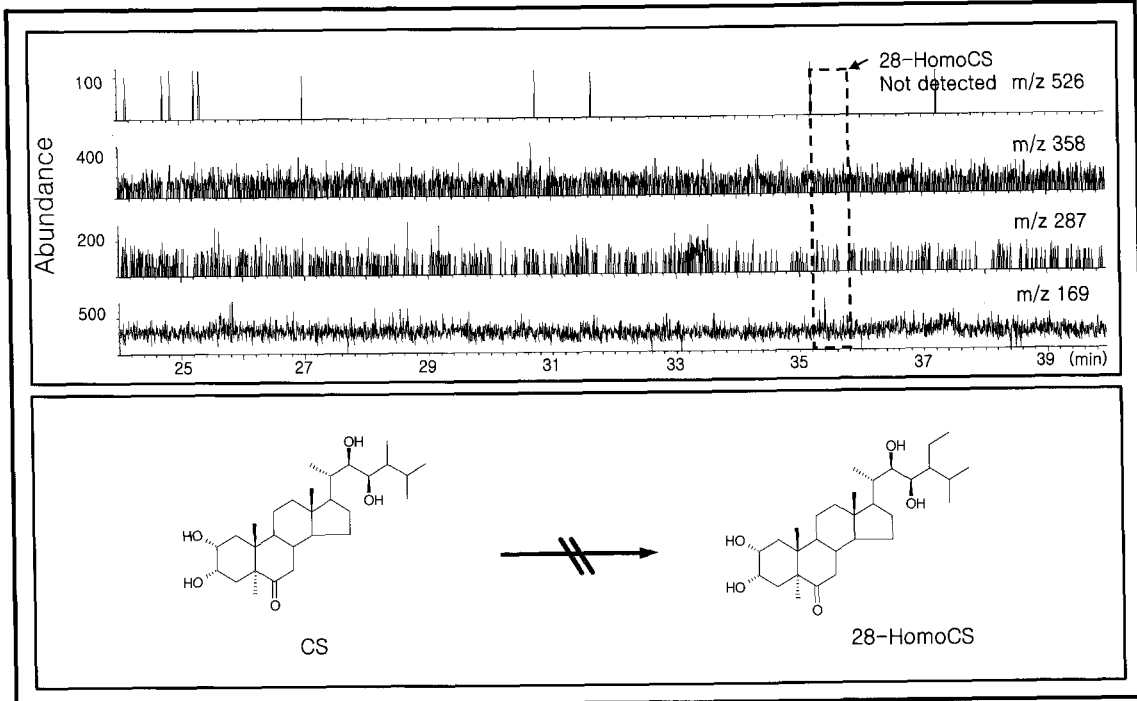


Figure 2. GC-SIM analysis for 28-homoCS converted from CS in young rice plant.

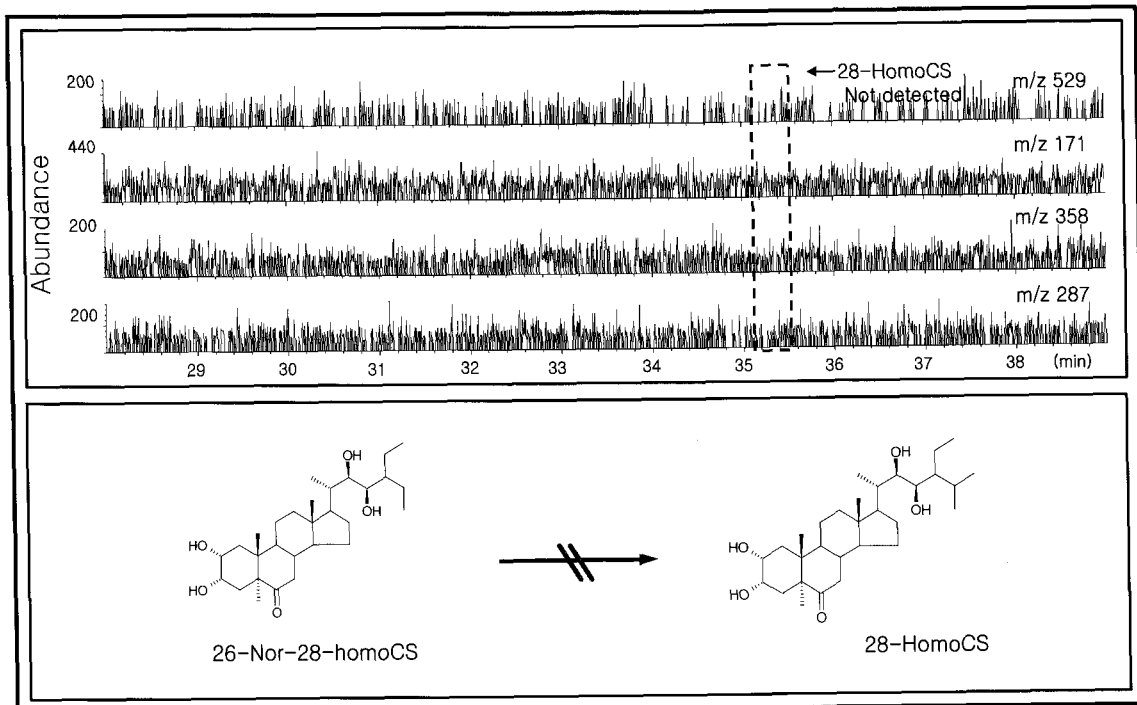


Figure 3. GC-SIM analysis for 28-homoCS converted from 26-nor-28-homoCS in young rice plant.

*CYP85A2*), 토마토 (*CYP85A1*, *CYP85A3*), 벼 (*CYP85A1*) 등에서 그 존재가 알려졌는데, 애기장대의 *CYP85A1*, *CYP85A2* 모두 BR C-6 oxidase활성을 갖고 있다고 알려졌다. 특히 *CYP85A2*는 *CYP85A1*보다 더 강력한 효소 활성을 갖고 있으며, 특히 CS에서 BL의 전환을 촉매 하는 BL synthase 활성은 애기장대의 *CYP85A2*만 갖고 있음이 보고되었다 (Bishop et al. 1996., 1999, Hong et al., 2002, Li et al. 1999). 또한, 벼 (*Oryza sativa*)에서도 BL, CS, DS, 6-deoxoCS, 28-homoTY, 28-homoTE가 동정되었고 (Abe et al. 1984, 1995; Abe 1991), *CYP85A*가 존재함이 밝혀져 있어 (Hong et al. 2002),  $C_{28}$ -BRs 생합성 과정 중 CS에서 BL로의 전환과 동일한 반응이  $C_{29}$ -BRs 생합성 과정에서도 일어나는지 알아보려고 조제한 효소원에 28-homoCS를 기질로하여 28-homoBL이 생성되는지를 조사하였다.

그 결과 효소변환 후 HPLC를 통해 얻어진 분획 중 authentic 28-homoBL의 Rt와 일치하는 분획을 수집하여 BMB체화 한 뒤 GC-MS로 최종 분석한 결과 28-homoBL-BMB체로 예상되는 ions인  $m/z$  544, 358, 287, 185 등을 확인할 수 없었다 (Figure 4). 이를 통해, 벼에서는 28-homoCS에서 28-homoBL로의 전환이 일어나지 않음을 확인하였다.

## 고 찰

최근  $C_{27}$ -BRs 생합성 경로의 마지막 산물인 28-norCS가 CS로 전환됨이 확인되어 식물체 내 BRs의 생합성이 복잡하게 연결되어 있을 가능성이 확인되었다 (Kim et al. 2004). 이는  $C_{29}$ -BRs 생합성이  $C_{27}$ -BRs 또는  $C_{28}$ -BRs 생합성과 연결되어 있을 가능성을 시사하는 것으로 강낭콩으로부터 STR, STN, 28-homoTY, 28-homoCS가 동정되어  $C_{29}$ -BRs의 생합성도  $C_{27}$ -BRs 또는  $C_{28}$ -BRs와 같이 동일한 탄소 골격을 갖고 있는 phytosterol인 STR로부터  $C_{27}$ -BRs 또는  $C_{28}$ -BRs 생합성 과정에서 일어나는 것과 동일한 일련의 반응들을 거쳐 생합성 되고 있을 가능성이 확인되었다 (Kim et al. 2006). 이는 28-homoCS가 보다 높은 생리활성을 나타내는 CS로 전환될 가능성이 높음을 시사하는 연구결과라 하겠다.

벼(*Oryza sativa*)의 이삭에서부터  $C_{28}$ -BRs 이외에  $C_{29}$ -BRs인 28-homoTE와 28-homoTY가 동정되었으며, 이는 벼 식물체 내에  $C_{28}$ -BRs와  $C_{29}$ -BRs의 생합성 과정이 존재하고 있을 가능성을 나타내는 결과로, 이를 전제로  $C_{29}$ -BRs에서  $C_{28}$ -BRs의 전환을 두 생합성 경로의 최종산물인 28-homoCS와 CS의 상호전환 및 28-homoCS에서 28-homoBL로의 전환을 조사하였다. 이 결과를 통해  $C_{29}$ -BRs와  $C_{28}$ -BRs 생합성의 연결은

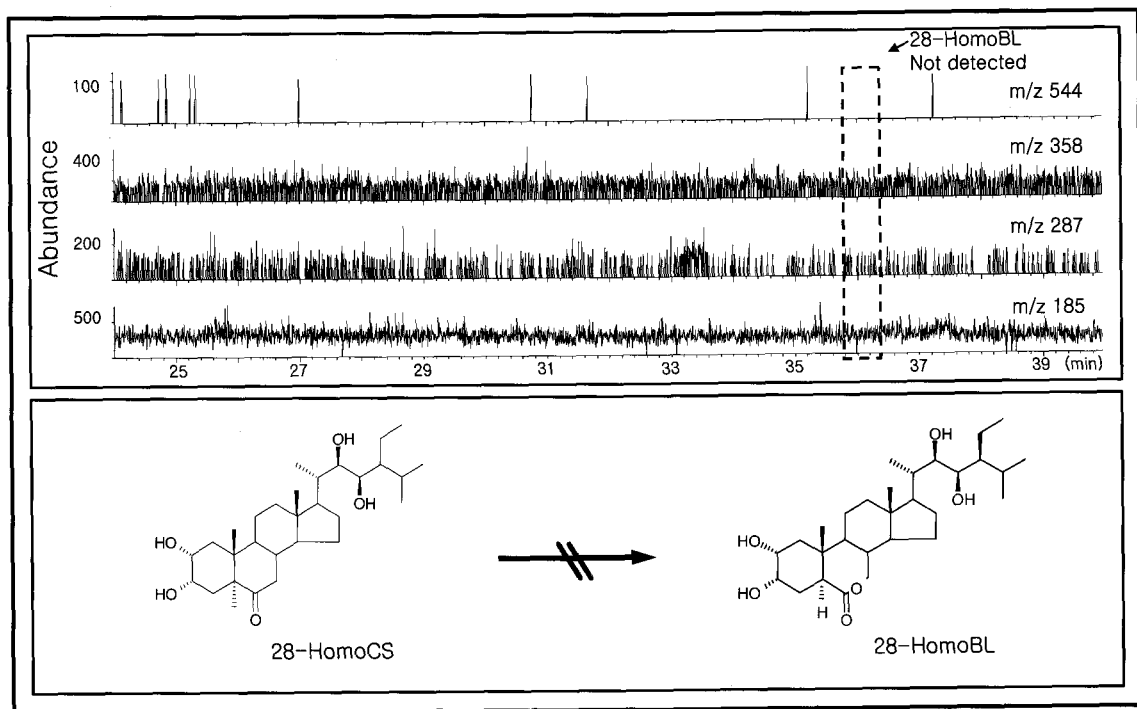


Figure 4. GC-SIM analysis for 28-homoBL converted from 28-homoCS in young rice plant.

28-homoBL에서 BL로의 전환이 아니라 28-homoCS에서 CS로의 전환을 통해서 연결 되어 있을 것이라 예상할 수 있다 (ure. 5). 일반적인 생체 화합물의 demethylation의 반응은 먼저 C-28위치의 methyl기가 산화되어 hydroxyl기를 만들고 또 다시 산화가 진행되어 aldehyde 와 carboxylic acid의 형태를 거친 후 CO<sub>2</sub>를 방출하는 과정을 거치는 것으로 사료된다. 이런 점을 감안할 때 28-homoCS에서 CS로의 demethylation 과정도 Figure 6과 같은 demethylation 반응을 통해

CS로 전환되리라 생각된다.

한편, 28-homoCS는 CS뿐만 아니라 C-26의 demethylation을 통해 26-nor-28-homoCS로도 전환됨을 확인 할 수 있었다. 이는 CS, BL, 28-norCS가 각각 26-norCS, 26-norBL 및 26,28-norCS로 전환되어 활성을 잃어감이 알려져 있어 28-homoCS의 C-26위치의 demethylation도 같은 맥락으로 28-homoCS의 생분해 과정으로 이해가 가능하다고 사료된다.

본 실험을 통하여 C<sub>29</sub>-BRs인 28-homoCS가 CS로 전환됨

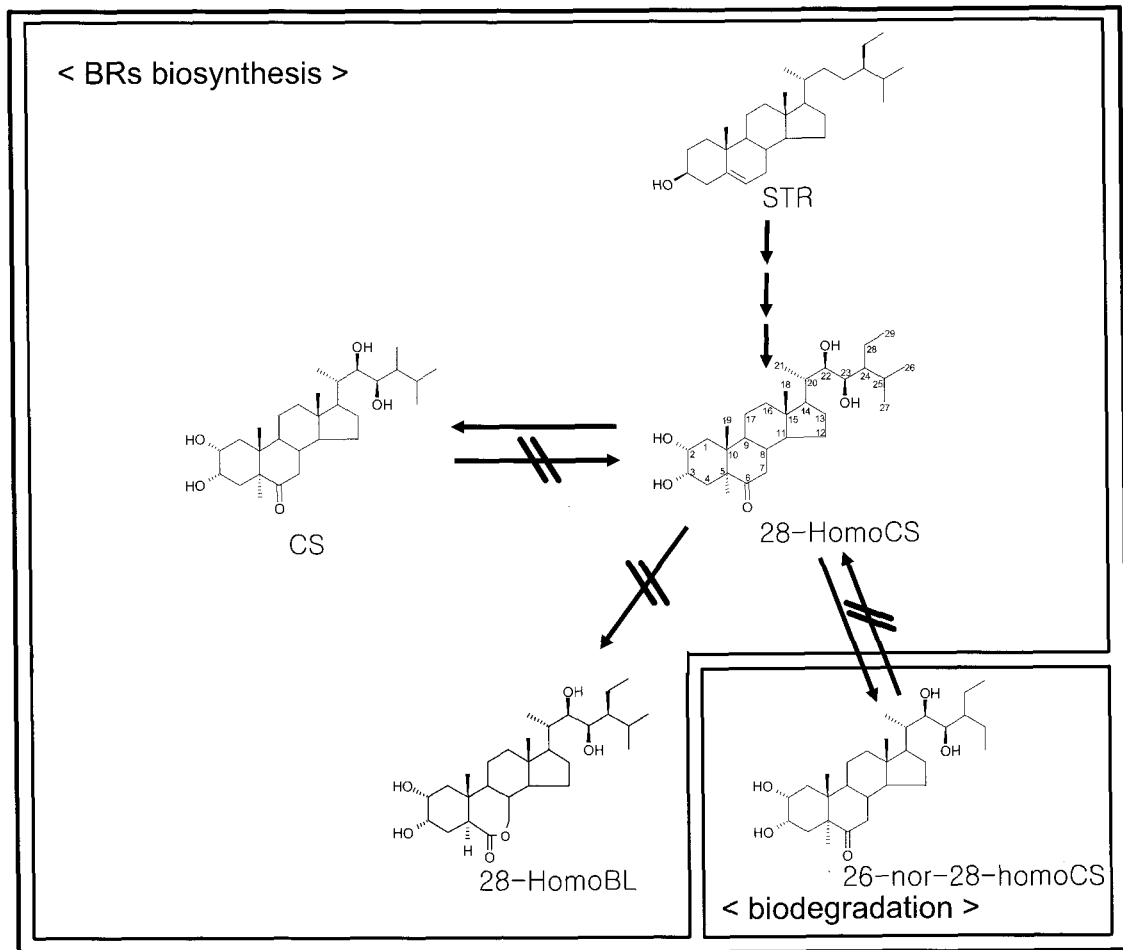


Figure 5. Proposed metabolism for 28-homoCS in young rice plants.

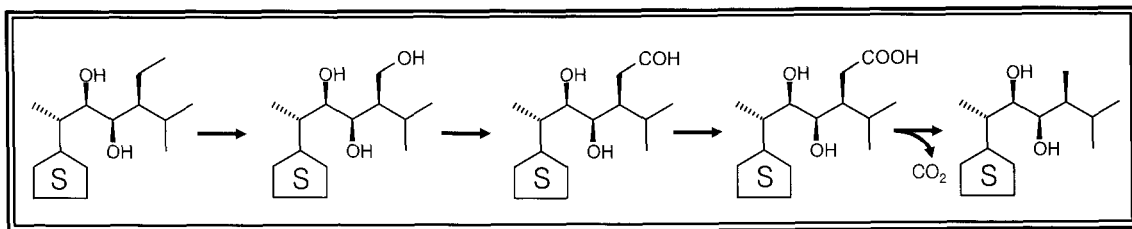


Figure 6. Possible reaction for demethylation of 28-homoCS to CS.

을 확인함으로써 생체 내의 CS의 함량조절에 C<sub>29</sub>-BRs의 생합성이 관여하고 있음을 알 수 있었다. 이는 C<sub>27</sub>-BRs 생합성이 28-norCS에서 CS를 통하여 연결되어 있음을 고려할 때 식물체 내의 서로 다른 side chain을 갖는 BRs의 생합성 경로는 각기 다른 탄소골격을 갖고 있는 phytosterol에서 부터 유사 또는 동일한 일련의 반응들을 통하여 각각의 최종산물을 만들고 최종적으로 CS로 전환되어 CS 자체가 활성을 나타내거나 CS가 BL로 전환이 일어나 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

## 적 요

BRs의 생합성 경로는 C<sub>28</sub>-BRs 생합성 경로 외에 C<sub>27</sub>-BRs 생합성 경로가 존재함이 확인되었고, 최근 C<sub>29</sub>-BRs의 생합성 경로가 존재함이 보고되어 BRs의 생합성 과정이 복잡하게 연결되어 있을 가능성이 예상되었다. 이에 C<sub>29</sub>-BRs인 28-homoTE와 28-homoTY 등이 동정된 벼의 유식물을 대상으로 하여 C<sub>29</sub>-BR인 28-homoCS의 대사 과정을 조사하였다. 그 결과 *in vitro* 효소변환 연구를 통해 28-homoCS은 CS와 26-nor-28-homoCS으로 전환됨을 확인 할 수 있었으며, 그 역반응인 CS에서 28-homoCS로 또는 26-nor-28-homoCS에서 28-homoCS로의 전환은 일어나지 않음을 알 수 있었다. 이는 C<sub>29</sub>-BRs인 28-homoCS은 C-28위치의 demethylation에 의해 보다 강한 활성의 C<sub>28</sub>-BRs인 CS로 생합성 되는 과정과 C-26 위치의 demethylation에 의해 26-nor-28-homoCS으로 생분해 되는 과정이 존재함을 최초로 확인하였다. 한편, C<sub>28</sub>-BRs인 CS에서 BL로의 전환과 동일한 반응이 C<sub>29</sub>-BRs에서도 일어나는지 확인하고자 하였으나 벼 유식물에서는 28-homoCS에서 28-homoBL로 전환되지 않음을 확인 할 수 있었다. 이는 C<sub>29</sub>-BRs와 C<sub>28</sub>-BRs의 생합성과정의 연결이 28-homoCS에서 CS를 통하여 있음을 알 수 있었다. 따라서 28-homoCS에서 CS로 전환되는 과정을 통하여 C<sub>29</sub>-BRs 또한 C<sub>28</sub>-BRs와 동일한 과정을 거쳐 활성형의 CS로 전환됨을 확인 할 수 있었으며, BRs의 생합성은 C<sub>27</sub>-BRs과 C<sub>28</sub>-BRs의 생합성과정과 연결된 것처럼 C<sub>29</sub>-BRs 또한 C<sub>28</sub>-BRs 생합성 과정과 연결되어 있음을 확인 할 수 있었다. 즉, 활성형 BR인 CS은 C<sub>27</sub>-BRs, C<sub>28</sub>-BRs의 생합성 과정뿐만 아니라 C<sub>29</sub>-BRs의 생합성 과정을 통하여 생성되는 과정이 식물체내에 존재함을 확인 할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 2006년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

## 참고문헌

- Abe H (1991) Rice-lamina inclination, endogenous levels in plant tissues and accumulation during pollen development of brassinosteroids. In: Cutler HG, Yokota T, Adam G eds., *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 200-207
- Abe H, Nakamura K, Morishita T, Uchiyama M, Takatsuto S, Ikekawa N (1984) Endogenous brassinosteroids of the rice plant: Castasterone and dolichosterone. *Agric Biol Chem* 48: 1103-1104
- Abe H, Takatsuto S, Nakayama M, Yokota T (1995) 28-homotyphasterol, a new natural brassinosteroid from rice (*Oryza sativa* L.) bran. *Biosci Biotech Biochem* 59: 176-178
- Bishop GJ, Harrison K, Jones J (1996) The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell* 8: 959-969
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JD, Kamiya Y (1999) The tomato DWARF enzyme catalyzes C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1761-1766
- Bishop GJ, Yokota T (2001) Plants Steroid Hormones, Brassinosteroids: Current Highlights of Molecular Aspects on their Synthesis/Metabolism, Transport, Perception and Response. *Plant Cell Physiol* 42: 114-120
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Fujioka S (1999) Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom. In A Sakurai, T Yokota, SD Clouse, eds, *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 21-45
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y, Uozu S, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2002) Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *Plant J* 32: 495-508



- Kim TW, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Yokota T, Kim SK** (2004) Novel biosynthetic pathway of castasterone from choleseol in tomato. *Plant Physiol* 135: 1231-1242
- Kim YS, Joo SH, Hwang JY, Park CH, Kim SK** (2006). Characterization of C<sub>29</sub>-Brassinosteroids and Their Biosynthetic Precursors in Immature Seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Bull Korean Chem Soc* 27. 1117-1118
- Li J and Chory J** (1999). Review article. Brassinosteroid actions in plants. *J Exp Bot* 50; 275-282.
- Sakurai A** (1999) Biosynthesis. *In* A Sakurai, T Yokota, SD Clouse, eds, *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 137-161
- Yokota T** (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci* 2: 137-143
- Yokota T** (2000) Brassiniosteroids. *In* BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and molecular biology of plants*. Amer Soc Plant Physiol, Maryland, pp. 901-911
- Yokota T, Nomura T, Nakayama M** (1997) Identification of brassinosteroids that appear to be derived from campesterol and cholesterol in tomato shoots. *Plant Cell Physiol* 38: 1291-1294
- 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

(접수일자 2007년 6월 29일, 수리일자 2007년 7월 20일)