

## 강낭콩 미숙종자로부터 Gibberellin 3 $\beta$ -Hydroxylase정제 및 성질

곽 상 수  
(일본 이화학연구소 국제프론티어연구시스템)

## Purification and Characterization of Gibberellin 3 $\beta$ -Hydroxylase from Immature Seeds of *Phaseolus vulgaris*

Kwak, Sang-Soo  
(International Frontier Research Programs, The Institute of Physical  
and Chemical Research : RIKEN, Wako, Saitama 351-01, Japan)

### Abstract

Gibberellin(GA) 3- $\beta$  hydroxylation is very important for the shoot elongation in the higher plants, since only 3 $\beta$ -hydroxylated GAs promote shoot elongation in several plants.

Fluctuation of 3 $\beta$ -hydroxylase activity was examined during seed maturation using two cultivars of *P. vulgaris*, Kentucky Wonder (normal) and Masterpiece (dwarf). Very immature seeds of both cultivars contain high level of 3 $\beta$ -hydroxylase activity (per mg protein). Both cultivars showed maximum of enzyme activity (per seed) in the middle of their maturation process.

Gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase catalyzing the hydroxylation of GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub> was purified 313-fold from very early immature seeds of *P. vulgaris*. Crude soluble enzyme extracts were purified by 15% methanol precipitation, hydrophobic interaction chromatography, DEAE ion exchange column chromatography and gel filtration HPLC. The 3 $\beta$ -hydroxylase activity was unstable and lost much of its activity during the purification. The molecular weight of purified enzyme was estimated to be 42,000 by gel filtration HPLC and SDS-PAGE. The enzyme exhibited maximum activity at pH 7.7. The

Km values for [2.3-<sup>3</sup>H] GA<sub>20</sub> and [2.3-<sup>3</sup>H] GA<sub>9</sub> were 0.29 μM and 0.33 μM, respectively. The enzyme requires 2-oxoglutarate as a cosubstrate; the Km value for 2-oxoglutarate was 250 μM using <sup>3</sup>H GA<sub>20</sub> as a substrate.

Fe<sup>2+</sup> and ascorbate significantly activated the enzyme at all purification steps, while catalase and BSA activated the purified enzyme only. The enzyme was inhibited by divalent cations Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup>.

Effects of several GAs and GA analogues on the purified 3β-hydroxylase were examined using [<sup>3</sup>H]GA<sub>9</sub> and GA<sub>20</sub> as substrates. Among them, GA<sub>5</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>15</sub>, GA<sub>20</sub> and GA<sub>44</sub> inhibited the enzyme activity.

[<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H] GA<sub>20</sub> was converted by the partially purified enzyme preparation to [<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H] GA<sub>1</sub>, GA<sub>5</sub> and GA<sub>6</sub>, which were identified by GC-MS. GA<sub>9</sub> was converted only GA<sub>4</sub>. GA<sub>15</sub> and GA<sub>44</sub> were converted to GA<sub>37</sub> and GA<sub>38</sub>, respectively. GA<sub>5</sub> was epoxidized to GA<sub>6</sub> by the same preparation. This suggests that 3β-hydroxylation of GA<sub>20</sub> and epoxidation of GA<sub>5</sub> are catalyzed by the same enzyme in *P. vulgaris*.

## 서 론

고등 식물의 신장제어에는 성장촉진호르몬인 gibberellin (GA)이 가장 중요하게 관여하고 있다는 것은 잘 알려져 있다. GA는 고등 식물에 있어서 경엽부의 신장촉진, 종자의 휴면타파, 단위결실유도 등 여러가지 생리현상에 관여하는 중요한 식물호르몬이다. 1920년대부터 시작된 GA의 연구는 천연으로부터 새로운 GA의 추출, 구조 결정 및 농업적 응용에 미치는 영향 등을 중심으로 진행되어 왔다. 1970년 전후부터는 GA의 생합성에 관한 연구가 무세포계(cell-free system)를 이용하여 활발히 진행되고 있으며 최근에는 GA의 분자생물학적연구가 다각도로 이루어지고 있다.

GA의 생합성은 탄소수 6개(C 6)인 mevalonic acid(MVA)로부터 시작되어 중요 중간 대사물질인 *ent*-Kaurene, GA<sub>12</sub>-aldehyde을 거쳐 여러가지 GA로 만들어지는 과정으로 구성되어진다 (Fig. 1). C<sub>20</sub>-GA는 C<sub>19</sub>-GA의 전구체로 20위의 탄소가 탈 탄소되어 C<sub>19</sub>-GA로 전환된다. C<sub>19</sub>-GA중에서 특히 3β위에 수산기를 가지는 GA는 높은 생리활성을 나타내나, 2β위에 수산기가 도입됨으로써 GA의 생리활성은 저하되거나 활성을 소실하게된다. 그러므로 GA는 3β 수산화에 의한 활성화와 2β 수산화에 의한 불활성화의 2 단계의 반응에 의해 제어되어진다고 말할 수 있다 (Graebe, 1987) (Fig. 2).

현재, 약 80 종류의 GA가 천연으로부터 동정되어 있으나 이중에서 생리활성을 갖는 GA는 극히 한정되어 있다. GA생합성상에서 유전적 결함이 있는 옥수수 (*d1*유전자) (Spray *et al.*, 1984), 완두콩(*k*유전자) (Ingram *et al.*, 1984),

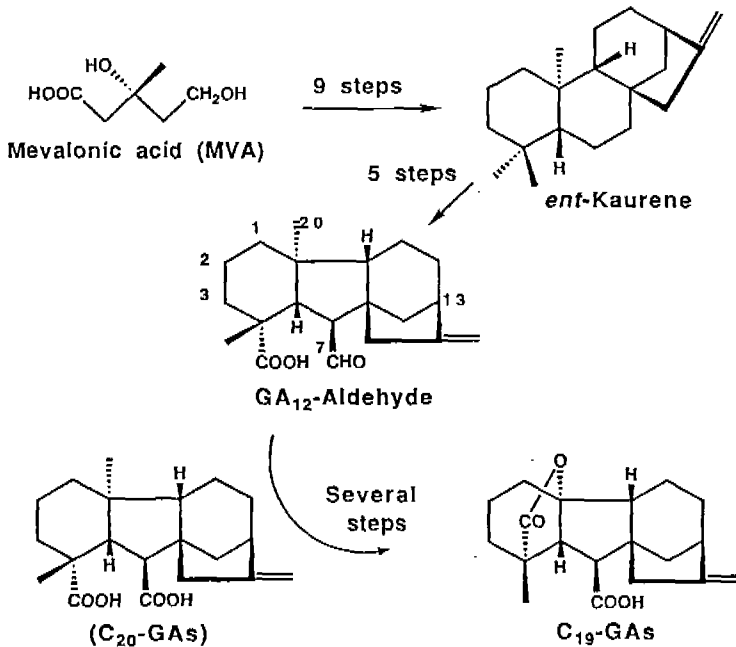


Fig. 1. General biosynthetic pathways of gibberellins.



이 연구에서는 GA<sub>1</sub>을 주요 내생 GA로서 다량 함유하고 있는 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris* L.) 미숙 종자를 재료로하여, GA의 활성 발현 기구를 해명하는 것을 목적으로 3 $\beta$ -hydroxylase의 해석이 수행되었다 (Kwak *et al.*, 1988a, 1988b, 1988c, 1988d, Kamiya and Kwak, 1990).

## 본 론

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 식물재료

1986년, 1987년 여름 동경에서 2품종의 강낭콩(*P. vulgaris*), 즉 Kentucky Wonder(정상종)와 Masterpiece(왜성종)을 포장조건에서 재배하였다. 개화 후 일정일마다 미숙 종자를 채취하여 종자의 생육곡선(Fig. 3-C)을 조사하고 종자성숙에 따른 효소액을 조제하였다.

#### 2) 효소액의 조제

미숙종자의 배와 종피를 분리하여, 배만으로 무세포계를 조제하였다. 종피를 제외한 배와 같은 양의 인산 buffer(0.05 M, pH 8.0)를 유발에 넣고 공기 중의 산소와의 접촉을 가급적 피하면서 마쇄한다. 마쇄후 혼합액을 2중가제로 여과한 다음, 여과액을 4°C, 200,000 g에서 1시간 초원심분리한다. 초원심분리에서 얻어진 상정액을 조효소액으로 하여 dry ice 위에서 pellet을 만든 후 액체질소 freezer에 보존하여 실험에 사용했다.

### 3) 3 $\beta$ -Hydroxylase의 정제

(1) 15% MeOH처리: 조효소액에 메타놀(-20 °C에서 냉각한)을 최종 15%농도가 되도록 첨가하여 원심분리한 후 침전단백질을 제거했다. 그리고 상정액을 Buffer A(30% glycerol, 0.2 M Sucrose, 2 mM DTT를 포함한 pH 8.0의 0.05 M 인산 buffer를 이하 buffer A로 함)로 2시간 투석을 하였다.

(2) 소수성크로마토그래피 : 메타놀처리후 buffer A를 사용하여 투석한 효소액에 포화유산을 20% 농도가 되도록 첨가한 다음 Butyl-Toyopearl 650s (2.2 x 20 cm) 칼럼으로 소수성크로마토그래피를 행하였다.

(3) 이온교환크로마토그래피 : Butyl-Toyopearl 650s에서 분리한 활성구를 한외여과막(Amicon-YM 10)으로 농축후, DEAE-Toyopearl 650s (2.2 x 20 cm)칼럼을 사용하여 이온교환크로마토그래피를 행하였다.

(4) HPLC에 의한 겔여과크로마토그래피 : DEAE-Toyopearl 650s의 주활성구분을 한외여과막으로 농축한 후, TSK gel G3000SW (0.75 x 60 cm)칼럼을 사용한 HPLC로써 겔 여과크로마토그래피를 행하였다. (상세한 각 단계의 정제방법에 대해서는 참고문헌 6을 참고바람).

### 4) 효소활성의 측정법

표준효소반응액(200  $\mu$ l)은 효소액(buffer A로 희석된 100  $\mu$ l), 2-oxoglutarate (0.5 M, 2  $\mu$ l), ascorbate(0.5 M, 2  $\mu$ l), FeSO<sub>4</sub>(0.05M, 2 $\mu$ l), 기질(<sup>3</sup>H)GA<sub>20</sub>(333Bq, 2 $\mu$ l) 및 인산 buffer(0.05 M, pH 8.0, 92  $\mu$ l)로 조성되었다. 효소반응을 30 °C에서 1시간 반응시킨 후 0.8 ml의 증류수와 30 mg의 활성탄을 첨가하여 교반한 다음, (<sup>3</sup>H)으로 표지된 기질과 대사물을 활성탄에 흡착시켰다. 활성탄을 첨가하고

교반한 효소반응액을 원심분리한 다음 상정액의 일정 액(200  $\mu$ l)을 취하여 액체 scintillation counter로 방사활성을 측정하였다. 2, 3위에 ( $^3$ H)으로 표지된 (2, 3- $^3$ H) GA<sub>20</sub>는 3 $\beta$ 수산화반응에 의해 (2- $^3$ H) GA<sub>1</sub>와 ( $^3$ H) H<sub>2</sub>O를 정량적으로 생성한다는 것이 확인되었으므로 생성물인 ( $^3$ H) GA<sub>1</sub>의 방사활성의 측정대신에 ( $^3$ H)H<sub>2</sub>O를 측정함으로써 단시간에 효소활성을 구할 수 있었다.

3 $\beta$ -Hydroxylase활성의 지표로 사용한 1unit는 기질인 ( $^3$ H) GA<sub>20</sub>(1.21x10<sup>14</sup> Bq/mol) 333 Bq와 효소액이 30 °C에서 1시간동안 반응하여 ( $^3$ H)H<sub>2</sub>O 3x10<sup>-13</sup> mol을 생성할 때로 정의하였다.

#### 5) 단백질의 정량 및 전기영동

단백질의 정량은 Bradford의 방법(1976)을 따랐으며, 표준단백질은 BSA로 Bio-Rad사의 단백질 정량시약을 사용하였다. SDS-PAGE는 Laemmli의 방법(1970)을 따랐으며, Coomassie Brilliant Blue R-250를 사용하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 미숙종자성숙에 따른 3 $\beta$ -hydroxylase 활성의 변동

3 $\beta$ -hydroxylase를 정제하기 위해서는 효소활성이 높은 시기의 미숙종자를 사용할 필요가 있다. 예비실험으로부터 종자성숙에 따라 GA생합성 억제물질이 생산되고 있음이 예상되었다(Kwak *et al.*, 1988a, 1988c). 따라서 각 생육단계로부터 조제한 조효소액을 소수성 크로마토그래피를 사용하여 효소를 부분 정제한 후 3 $\beta$ -hydroxylase 활성의 변동을 조사하였다.

그 결과, 단위 단백질당의 효소활성은 매우 미숙한 종자로부터 조제한 효

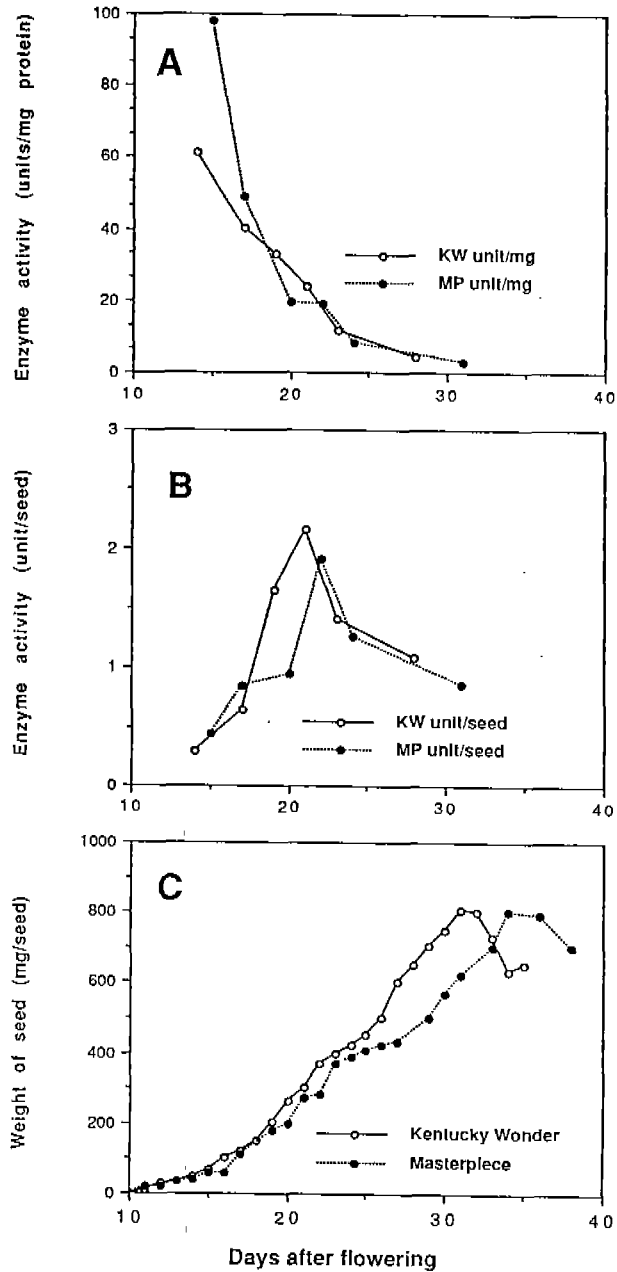


Fig. 3. (A) and (B). The fluctuation of gibberellin  $3\beta$ -hydroxylase activity during the seed maturation of two cultivars of *P. vulgaris*, Kentucky Wonder (KW, normal) and Masterpiece (MP, dwarf). (A) The  $3\beta$ -hydroxylase activity per mg protein and (B) the  $3\beta$ -hydroxylase activity per seed. (C) Growth curves of seeds of two cultivars.



소에서 가장 강한 활성을 보였으며, 종자가 성숙함에 따라 저하하는 경향을 보였다(Fig. 3-A). 한편, 종자 한 개당의 효소활성은 매우 미숙한 종자에서는 약하나, 생육 중반기(개화후 20일 전후)까지는 활성이 서서히 증가하였다. 그러나 종자가 더욱 성숙함에 따라 활성은 저하하는 경향을 보였다(Fig. 3-B). 사용한 두 품종 즉 Kentucky Wonder(KW)와 Masterpiece(MP)의 종자성숙에 따른 3 $\beta$ -hydroxylase 활성의 차는 거의 없었다. 종자성숙에 따른 3 $\beta$ -hydroxylase 활성의 변동은 내생 GA함량의 변동과 거의 일치하는 경향을 보였다(Kwak *et al.*, 1988a).

이상의 결과로, 3 $\beta$ -hydroxylase의 정제를 위해서는 단위 단백질당의 효소활성이 강한 개화후 15일전후의 매우 미숙한 종자를 다량 수확하여 조효소액을 조제할 필요가 있었다.

## 2) 3 $\beta$ -Hydroxylase의 정제

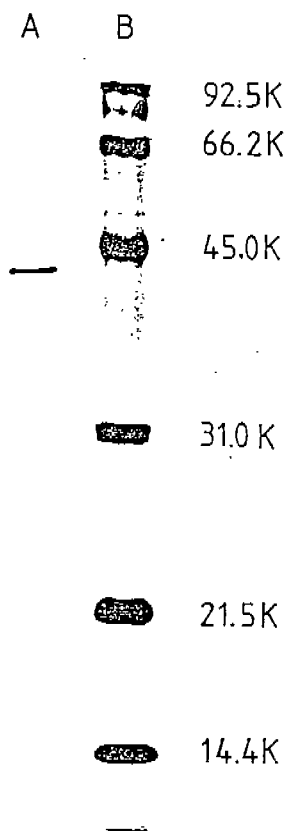
강낭콩 미숙종자(개화후 15일전후의 6,661개의 미숙종자)로부터 GA 3 $\beta$ -hydroxylase의 정제를 한 결과, 매우 불안정한 효소임에도 불구하고 4단계의 정제방법으로 3 $\beta$ -hydroxylase의 비활성을 조효소액에 비해 약 313배까지 높힐 수 있었다 (Table 1). 전환성의 회수율은 약 1.7%이었다. 정제한 3 $\beta$ -hydroxylase는 현재까지 보고되어 있는 어떠한 GA수산화효소보다도 높은 비활성을 나타내는 것으로서, SDS-PAGE를 이용하여 효소의 순도를 측정 한 결과 Fig. 4와 같이 분자량 42,000전후의 단일 밴드를 나타내었다.

저자도 이전 3 $\beta$ -hydroxylase를 정제하는 데 있어서 여러가지 방법을 시도하였으나, 그 어떤 방법도 효소활성의 큰 실패로 비활성을 높힐 수 없었다. 그

**Table 1.** Purification of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase from immature seeds of *P. vulgaris* L.

Purification step	Total protein mg	Total activity units <sup>a</sup>	Specific activity units / mg	Yield %	Purification -fold
Crude extract	1587	21750	13.7	100.0	1.0
Methanol precipitation	1206	19580	16.2	90.0	1.2
Butyl-Toyopearl	46.14	4989	101.5	22.9	7.4
DEAE-Toyopearl	4.18	1979	473.4	9.1	34.6
Gel filtration HPLC	0.086	369	4291	1.7	313

<sup>a</sup> 1 unit is  $3 \times 10^{-13}$  mol / h when [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> was used as substrate.



**Fig. 4.** SDS-PAGE of purified gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase. (A) purified enzyme (5  $\mu$ g protein), (B) Protein standards (25  $\mu$ g of each protein). The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

태서 정제도를 높이기 위하여 다음의 4가지 점을 충분히 고려하여 효소를 정제한 결과 높은 정제도에 성공할 수 있었다. (1) 정제중의 효소안정화제로서 30% glycerol, 0.2 M sucrose, 2 mM DTT를 사용 buffer에 첨가하였다. (2) 효소활성을 단시간에 측정하는 방법을 개발하여  $(^3\text{H})\text{GA}_{20}$ 을 기질로써 사용하여 효소반응 후 생성되는  $(^3\text{H})\text{H}_2\text{O}$ 을 측정하여 효소활성을 구했다. (3) 효소의 높은 소수성을 이용하여 소수성 크로마토그래피를 정제단계에 도입하였다. (4) 희박한 농도의 효소를 사용하여 효소반응을 할 경우는 cofactor 이외에 안정화제로서 catalase와 BSA를 첨가하여 반응을 행하였다.

### 3) $3\beta$ -Hydroxylase의 성질

정제한  $3\beta$ -hydroxylase의 성질을 요약하면 다음과 같다(Kwak *et al.*, 1988b).  $3\beta$ -hydroxylase의 분자량은 약 42,000으로 효소반응의 최적 pH는 7.7 전후였다. 이 효소는 2가철과 2-oxoglutarate를 요구하는 산소첨가효소(EC-1-14-11-)로서 효소반응은 ascorbate, BSA, catalase에 의해 촉진되었다. 정제한  $3\beta$ -hydroxylase에 대한  $(^3\text{H})\text{GA}_{20}$ ,  $(^3\text{H})\text{GA}_9$ , 2-oxoglutarate의  $K_m$ 치는 각각  $0.29\ \mu\text{M}$ ,  $0.33\ \mu\text{M}$ ,  $250\ \mu\text{M}$ 이었다. 또한 이 효소는  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ 에 의해 효소반응이 강하게 저해되었으며, 다른 금속이온에 의해  $\text{Fe}^{2+}$ 의 역할을 대신하게 할 수는 없었다.

### 4) $3\beta$ -Hydroxylase의 기질특이성

$3\beta$ -hydroxylase의 기질특이성을 밝힘으로써 이 효소가 GA생합성상의 어떤 단계에서 작용하는가를 예상할 수 있다. 하나의 효소에 기질이 될 수 있는

**Table 2.** Effects of non-labelled gibberellins and gibberellin derivatives on the release of  $^3\text{H}$  from the  $3\beta$ -position of  $\text{GA}_{20}$  and  $\text{GA}_9$

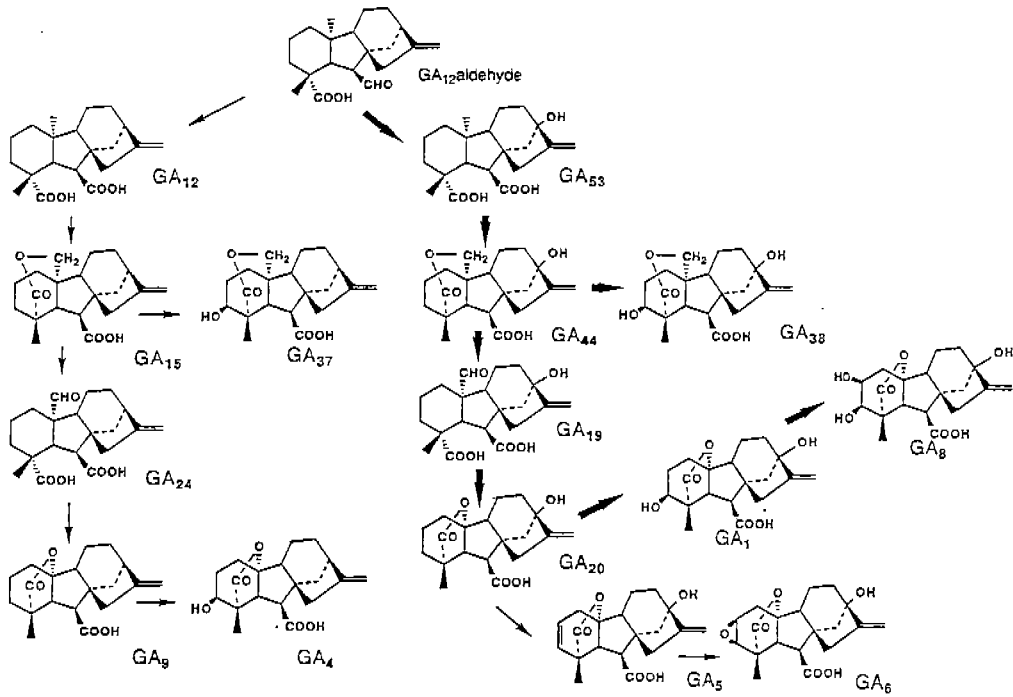
Gibberellins <sup>a</sup>	Inhibition of $3\beta$ -hydroxylation (%) <sup>b</sup>	
	$[^3\text{H}]\text{GA}_{20}$ as a substrate	$[^3\text{H}]\text{GA}_9$ as a substrate
$\text{GA}_5$	46	65
$\text{GA}_9$	36	31
$\text{GA}_{15}$	51	48
$\text{GA}_{20}$	42	59
$\text{GA}_{44}$	18	41
Others ; $\text{GA}_1, \text{GA}_3, \text{GA}_4, \text{GA}_8, \text{GA}_{12},$ $\text{GA}_{19}, \text{GA}_{22}, \text{GA}_{24}, \text{GA}_{29}, \text{GA}_{53},$ $\text{GA}_9\text{-Me}^c, \text{GA}_{20}\text{-Me}, \text{GA}_{24}\text{-Me}$		0 (No inhibition)

<sup>a</sup> The concentration of gibberellins used in these reactions was  $1 \times 10^{-5}\text{M}$ .

<sup>b</sup> Inhibition % =  $100 - (\text{enzyme activity with non-labelled GA} / \text{enzyme activity of control}) \times 100$ .  
 $[^3\text{H}]\text{GA}_{20}$  (666 Bq, 6 pmol) and  $[^3\text{H}]\text{GA}_9$  (666 Bq, 0.4 pmol) were incubated with DEAE-purified enzyme (2.4  $\mu\text{g}$  protein) for 1.5 h. Release of  $^3\text{H}$  from  $[^3\text{H}]\text{GA}_{20}$  and  $[^3\text{H}]\text{GA}_9$  without non-labelled GA were 47 Bq and 43 Bq, respectively.

<sup>c</sup> Me = methyl ester at C-7.

화합물은 서로 길항한다는 것에 착안하여  $(^3\text{H})\text{GA}_{20}$  또는  $(^3\text{H})\text{GA}_9$ 를 기질로 한 표준반응에 여러 종류의 비표지 GA를 첨가하여  $3\beta$ 수산화반응에 대한 길항 조사를 하였다.



**Fig. 5.** Biosynthetic pathways of GAs in immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. The pathways were refined by studies on the substrate specificity of the 3 $\beta$ -hydroxylase. Thick arrows show the main pathway and light arrows the minor pathway. All the intermediates were incubated in the cell-free system and products were identified by full-scan GC-MS. Metabolism of GA<sub>1</sub> to GA<sub>8</sub> was found in a cell-free system from matured seed (Patterson and Rappaport, 1974).

그 결과, Table 2와 같이 3 $\beta$ 수산화반응에 길항저해를 나타낸 GA는, (1) A환에 2중결합을 가진 GA<sub>5</sub>, (2) A환에  $\gamma$ -lactone을 가진 GA<sub>9</sub>와 GA<sub>20</sub>, 그리고 (3)  $\delta$ -lactone을 가진 GA<sub>15</sub>와 GA<sub>44</sub>였다(이들 GA의 구조는 Fig. 5를 참조). 한편 3 $\beta$ 수산화반응에 대한 저해활성을 나타내지 않은 GA는 (1) 3위 또는 2위에 수산기를 가진 GA, (2) A환에 lactone을 형성하지 않은 GA, (3) 7위의 COOH기가 메틸화된 GA(저해활성을 가진 GA도 포함) 등이었다.

이상의 길항저해의 실험으로부터 얻어진 3 $\beta$ -hydroxylase의 기질이 될 수 있

는 GA는 (1) A환에 lactone을 가질 것, (2) 2, 3위 어느 쪽도 수산기가 존재하지 않을 것, 또한 (3) 7위가 카르복실기일 것이 공통으로 필요하다는 것이 밝혀졌다. Fig. 5는 강낭콩 미숙 종자에 있어서 GA생합성상의 3 $\beta$ 수산화반응이 이상의 필수조건을 갖춘 GA의 단계에서만 일어나는 것을 나타낸 것이다. 강낭콩 미숙종자 에서는 Fig. 5에서 처럼 GA<sub>9</sub>, GA<sub>15</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>44</sub>는 각각 GA<sub>4</sub>, GA<sub>37</sub>, GA<sub>1</sub>, GA<sub>38</sub>으로 3 $\beta$ 수산화가 일어나는 것이 증명되어 있으나, GA<sub>5</sub>의 대사에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다 (Takahashi *et al.*, 1986).

#### 5) 3 $\beta$ -Hydroxylase에 대한 GA<sub>5</sub>로부터 GA<sub>6</sub>으로의 epoxidation

GA<sub>5</sub>가 3 $\beta$ 수산화 반응을 저해한 것으로 보아, GA<sub>5</sub>는 3 $\beta$ -hydroxylase의 기질이 될 가능성이 시사되었다. 그래서 정제한 3 $\beta$ -hydroxylase와 (<sup>13</sup>C<sup>3</sup>H)GA<sub>5</sub>를 반응시켜서 그 생성물로 GA<sub>6</sub>을 GC-MS에 의해서 처음으로 동정하였다(Kwak *et al.*, 1988d). 이와같이 epoxy기를 가진 GA<sub>6</sub>는 이중결합을 포함하고 있는 GA<sub>5</sub>로부터 생합성된다는 것이 밝혀졌으며, 또한 GA<sub>5</sub>가 3 $\beta$ -hydroxylase의 기질이 되어 GA<sub>6</sub>에 변환되었다는 점과 GA<sub>5</sub>로부터 GA<sub>6</sub>으로의 cofactor 요구성이 GA<sub>20</sub>으로부터 GA<sub>1</sub>으로의 3 $\beta$  수산화와 같은 점으로부터 3 $\beta$ 수산화반응과 epoxy화 반응은 같은 효소에 의해 생합성된다는 것이 시사되었다.

## 결 론

GA 활성 발현에 있어서 중요한 3 $\beta$ 수산화반응을 촉매하는 효소의 해석을 강낭콩 미숙 종자를 재료로 수행한 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 종자성숙에 따른 3 $\beta$ -hydroxylase활성 (단위 단백질당)은 매우 미숙한 종자

로부터 조제한 효소에서 가장 높았다.

(2) 매우 미숙한 종자로부터 3 $\beta$ -hydroxylase의 정제를 행하여, 비활성을 약 313배까지 높힐 수 있었다.

(3) 3 $\beta$ -hydroxylase가 2-oxoglutarate의존형의 산소 첨가효소인 것과 효소의 대부분의 중요한 성질을 밝혔다.

(4) 3 $\beta$ -hydroxylase의 기질 특이성을 해석하여 이 효소의 GA생합성상의 위치를 밝혔다.

(5) GA<sub>6</sub>는 GA<sub>5</sub>로부터 생합성되는 것이 증명되었다. 또한 이 반응은 3 $\beta$ -hydroxylase에 의해 일어나는 것으로 3 $\beta$ 수산화반응과 epoxy화 반응은 동일 효소에 의해 일어나는 것이 시사되었다.

금후, 이 연구의 성과를 바탕으로 3 $\beta$ -hydroxylase의 세포내의 국재화(compartmentalization), 조직에 있어서 생합성 부위(localization)의 구명 및 효소 단백질의 구조 해석, 유전자 해석이 가능하게 되리라 기대되어진다. 또한 3 $\beta$ -hydroxylase의 특이적인 저해제를 탐색함으로써 새로운 왜화제(growth retardant)의 개발도 기대되어진다.

## 참 고 문 헌

1. Bradford, M.M. (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.
2. Graebe, J.E. (1987) Gibberellin biosynthesis and control. in *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38, 419-465.
3. Ingram, T.J., Reid, J.B., Gaskin, P., Willis, C.L., and MacMillan, J. (1984) Internode length in *Pisum*. The *Le* gene controls the 3 $\beta$ -hydroxylation of gibberellin A<sub>20</sub> to gibberellin A<sub>1</sub>. *Planta*, 160, 455-463.
4. Kamiya, Y., and Kwak, S.S. (1990) Partial characterization of the gibberellin

- 3 $\beta$ -hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. in Gibberellin Symposium Tokyo 1989. Edited Takahashi, N. will be published (1990) in Springer-Verlag.
5. Kwak, S.S., Kamiya, Y., Takahashi, M., Sakurai, A., and Takahashi, N. (1988a) Metabolism of GA<sub>20</sub> in a cell-free systems prepared from developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.*, 29, 707-711.
  6. Kwak, S.S., Kamiya, Y., Sakurai, A., Takahashi, N., and Graebe, J.E. (1988b) Partial purification and characterization of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Cell Physiol.*, 29, 935-943.
  7. Kwak, S.S., Kamiya, Y., Sakurai, A., and Takahashi, N. (1988c) Isolation of a gibberellin biosynthesis inhibitor from testas of *Phaseolus vulgaris* L. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 149-151.
  8. Kwak, S.S., Kamiya, Y., Yamane, H., Sakurai, A., Graebe, J.E., Phinney, B.O., and Takahashi, N. (1988d) Epoxidation of gibberellin A<sub>5</sub> to GA<sub>6</sub> by partially purified gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. in 13th International Conference on Plant Growth Substances, Calgary, Abstract 346.
  9. Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 222, 680-685.
  10. Murakami, Y. (1972) Dwarfing gene in rice and their relation to gibberellin biosynthesis. in *Plant Growth Substances 1970*. Edited by Carr, D. J. pp. 166-174. Berlin/Heidelberg/New York, Springer-Verlag.
  11. Patterson, R., and Rappaport, L. (1974) The conversion of gibberellin A<sub>1</sub> to gibberellin A<sub>8</sub> by a cell-free enzyme system. *Planta*, 110, 183-191.
  12. Spray, C., Phinney, B.O., Gaskin, P., Gilmour, S.J., and MacMillan, J. (1984) Internode length in *Zea mays* L. The dwarf-1 mutation controls the 3 $\beta$ -hydroxylation of gibberellin A<sub>20</sub> to gibberellin A<sub>1</sub>. *Planta*, 160, 464-468.
  13. Takahashi, M., Kamiya, Y., Takahashi, N., and Graebe, J.E. (1986) Metabolism of gibberellins in a cell-free system from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L.. *Planta*, 168, 190-199.

## 저 자 약 력

곽 상 수 (郭尙洙) 박사

1959. 2. 16. 생

1980. 2. 경북대학교 농학과 (농학사)

1984. 8. 경북대학교 대학원 농학과 (농학석사)

1988. 3. 일본 동경대학교 대학원 농예화학과 (농학박사)

1985. 4. - 88. 3. 일본이화학연구소 식물생활환제어연구실 연수생

1988. 4. - 현재 일본이화학연구소 국제Frontier연구System

식물제어Team Frontier연구원