

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

### I. GA<sub>20</sub>을 GA<sub>1</sub>으로 변환시키는 3 $\beta$ -Hydroxylase

郭尚洙·神谷勇治\*·樓井成\*·高橋信孝\*

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

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

### I. 3 $\beta$ -Hydroxylase Converting GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub>

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

(Plant Cell Biology Laboratory, Genetic Engineering Research Institute,

Korea Institute of Science and Technology and

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

#### ABSTRACT

Changes in activity of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase which converts [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub> were studied during seed maturation using partially purified enzyme preparations of two cultivars, Kentucky Wonder (normal) and Masterpiece (dwarf) of *Phaseolus vulgaris*. The specific activity of 3 $\beta$ -hydroxylase per seed reached maximum at 21 days after flowering and subsequently decreased during seed maturation in both cultivars. The ratios of conversion of [<sup>17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]</sup>GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub>, GA<sub>5</sub>, and GA<sub>6</sub> by the same amount of 3 $\beta$ -hydroxylase were almost identical. Epoxidation of GA<sub>5</sub> to GA<sub>6</sub> is also catalyzed by the partially purified 3 $\beta$ -hydroxylase preparation (Kobayashi *et al.*, 1991) and the conversion was inhibited by the substrates of 3 $\beta$ -hydroxylase. These results suggest that the same enzyme might catalyze 3 $\beta$ -hydroxylation of GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub> and epoxidation of GA<sub>5</sub> to GA<sub>6</sub>.

#### 서 론

현재 80여종의 지베렐린(GA)이 천연으로부터 분리되어, 그 구조가 결정되어 있으나 이중에서 생리활성을 갖는 GA는 극히 한정되어 있다. 지금까지의 연구결과에 의하면 GA 골격의 3 $\beta$ -위치의 수산화반응이 식물의 신장촉진등 생리현상발현에 대단히 중요하다고 밝혀져 있다(Graebe, 1987). 예로서 벼(Murakami, 1972), 옥수수(Spray *et al.*, 1984) 및 완두콩(Ingram *et al.*, 1984) 등의 왜성변이종을 사용한 GA의 대사실험에서 이러한 식물의 경엽부의 신장에는 GA<sub>20</sub>으로부터 GA<sub>1</sub>의 3 $\beta$ -위치의 수산화반응이 필수적이다(Fig. 1). 이는 GA<sub>1</sub>이 식물의 신장생장제어에 대단히 중요한 역할을 하고 있는 것으로 3 $\beta$ -수산화효소[EC 1.14.11.-]의 성질과 제어기구를 밝히는 것은 대단히 중요한

연구라 하겠다.

한편 영양생장기의 경엽부에는 내생 GA 함량이 매우 낮을 뿐 아니라 페놀성 화합물 등의 GA 생합성억제물질도 포함되어 있어 식물의 경엽부로부터 효소활성이 강한 무세포계(cell-free system)의 조제는 어려움이 있다. 그러나 콩과식물의 미성숙 종자내에는 영양생장기의 식물체에 비해 각종의 GA가 고농도로 축적되고 있어, 이들이 종자형성 및 발육에 중요한 역할을 하고 있을 것으로 여겨지므로 GA 생합성연구를 위한 좋은 재료가 된다(Durley *et al.*, 1971; Kamiya and Graebe, 1983; Takahashi *et al.*, 1986). 따라서 저자들은 GA의 활성기구를 해명하기 위하여 GA<sub>1</sub>을 주요 내생 GA로 많이 함유한 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.) 미성숙종자를 재료로 사용하여 3 $\beta$ -수산화효소의 성질을 밝히는 연구를 수행하고 있다(Takahashi *et al.*, 1986; Kwak

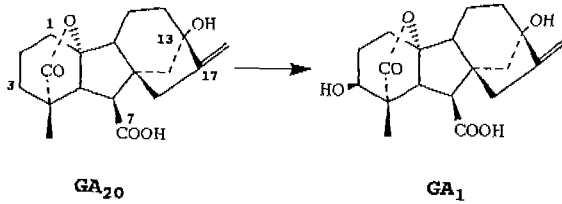


Fig. 1. The 3β-hydroxylation from GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub>. The numbers on GA<sub>20</sub> structure denote the carbon number of *ent*-gibberellin skeleton.

*et al.*, 1988a, 1988b, 1988c, Kobayashi *et al.*, 1991).

본 연구에서는 강낭콩 종자성숙에 따른 GA 3β-수산화 효소 활성의 변화를 정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece의 미숙종자로부터 부분 정제한 효소를 사용하여 조사하였다.

**재료 및 방법**

**실험재료 및 조효소액의 조제.** 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.)의 두품종(정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece)을 포장에서 관행에 준하여 재배하였다. 개화 시에 꽃에 색리본으로 표시를 하여 개화 후 10일부터 미성숙 종자를 수확하여 종자의 성장곡선을 조사하고, 성숙 단계가 다른 6단계의 미성숙 종자로부터 Kwak 등(1988b)의 방법에 따라 조효소액을 조제하였다. 성장단계별 조효소액 조제에는 가장 미성숙단계에는 1600개로부터 완전 성숙단계에는 150개의 종자를 사용하였다. 미성숙 종자의 배유와 종피를 분리한 후 배유만으로 조효소액을 조제하였다. 배유와 등량의 완충액 A(0.05 M 인산, pH 8.0)을 유발에 넣고 공기중의 산소와 접촉을 가급적 피하면서 신속하게 마쇄한다. 마쇄 후 혼합액을 이중가제로 여과한 다음, 여과액을 4℃, 2,000×g로 10분간 원심분리한 후, 상정액을 다시 4℃, 200,000×g에서 1시간 초원심분리하여 얻어진 상정액을 3β-수산화효소의 조효소액(약 40-65 ml)으로 하였다. 조효소액을 dry ice 위에서 pellet를 만든 후 액체질소 freezer에 보존하여 실험에 사용하였다.

**3β-수산화효소의 부분정제.** 조효소액에 -20℃에서 냉각한 메탄올을 15% 농도가 되도록 첨가하여 원심분리한 후 침전 단백질을 제거하였다. 상정액을 완충액 B(30% glycerol, 0.2 M sucrose, 2 mM DTT를 포함한 0.05 M 인산, pH 8.0)를 사용하여 4℃에서 1시간 투석한 후, 효소액에 포화유안을 20%가 되도록 첨가하여 Butyl-Toyopearl 650S (2.2×14 cm, Toso, Japan) 컬럼에 충전하였다. 완충액 B 중의 포화유안 농도를 20%로부터 0%까지의 농도구배로 소수성물질용 용출시킨 후, 완충액 B만으로 3β-수산화효소를 용출시켰다. 단백질의 정량은 Bradford(1976)의 방법

에 준하여 실시하였다.

**효소활성의 측정.** 3β-수산화효소의 기질인 [2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>(1.21×10<sup>5</sup> GBq/mol)은 Murofushi 등(1977)이 조제한 것을 분양받아 사용하였다. 효소활성을 위한 표준반응액(200 μl)은 효소액(완충액 B로 희석된 100 μl), ascorbate(0.5 M, 2 μl), 2-oxoglutarate(0.5 M, 2 μl), FeSO<sub>4</sub>(0.05 M, 2 μl), 기질인 [2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>(333 Bq, 2 μl) 및 완충액 A(92 μl)로 조성되었다. 효소정제 및 통상의 3β-수산화효소 활성은 [2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>을 기질로 사용하였으며 3β-수산화반응에 의해 [2-<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>과 [<sup>3</sup>H]H<sub>2</sub>O이 정량적으로 생성된다는 것이 확인되었으므로 생성물인 [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>의 방사활성을 측정하는 대신 [<sup>3</sup>H]GH<sub>20</sub>을 측정하는 방법으로 효소활성을 구하였다(Kwak *et al.*, 1988b). 효소반응을 30℃에서 1시간 반응시킨 후, 0.8 ml의 증류수와 30 mg의 활성탄을 첨가하여 교반한 다음, [<sup>3</sup>H]으로 표시된 기질과 대사물을 활성탄에 흡착시켰다. 이를 원심분리하여 상등액 200 μl을 액체 scintillation counter로 방사활성을 측정하여 3β-수산화효소 활성을 구하였다. 3β-수산화효소 활성의 지표로 사용한 1 unit는 기질인 [2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub> 300 Bq와 효소액을 30℃에서 1시간 반응하여 [<sup>3</sup>H]H<sub>20</sub>을 3×10<sup>-13</sup> mol을 생성할 때로 정의하였다.

**[17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>의 대사실험.** [17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>(1.75 GBq/mmol)은 B.O. Phinney 교수(University of California, Los Angels)로부터 분양받았다. 효소반응은 기질로 [17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub> 833 Bq을 사용하여 [2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>의 경우와 같은 방법으로 행한 후, 생성물의 분석은 Kwak 등(1988b)의 방법에 따라 ODS(4.6×100 mm)컬럼과 Nucleosil N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(4.6×100 mm) 컬럼을 사용하여 분석하였다. 생성물의 최종적인 정성분석은 Takahashi 등(1986)의 방법으로 gas chromatography-mass spectrometry로 하였다.

**각종 GA 및 GA유도체가 GA<sub>5</sub>의 epoxidation에 미치는 영향.** 15종의 GA와 3종의 GA유도체가 GA<sub>5</sub>로부터 GA<sub>8</sub>의 epoxidation에 미치는 영향을 조사하였다. Epoxidation에는 기질 [17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>5</sub> 500 Bq와 부분 정제한 3β-수산화효소(8.5 μg)에 각종 GA 및 유도체를 최종농도가 1×10<sup>-5</sup> M이 되도록 첨가하여 앞에서의 GA<sub>20</sub>의 효소반응과 같은 농도의 ascorbate, 2-oxoglutarate, FeSO<sub>4</sub>를 첨가하여 30℃에서 2시간 반응하여 생성물을 HPLC로 분석하였다.

**결 과**

**종자생장곡선.** 개화 후 10일부터 37일까지 미성숙 종자를 수확하여 종피와 배유를 분리한 후 종자, 배유, 종피의 중량을 측정하여 조사한 각각의 생장곡선은 Fig. 2와 같다. 정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Master-

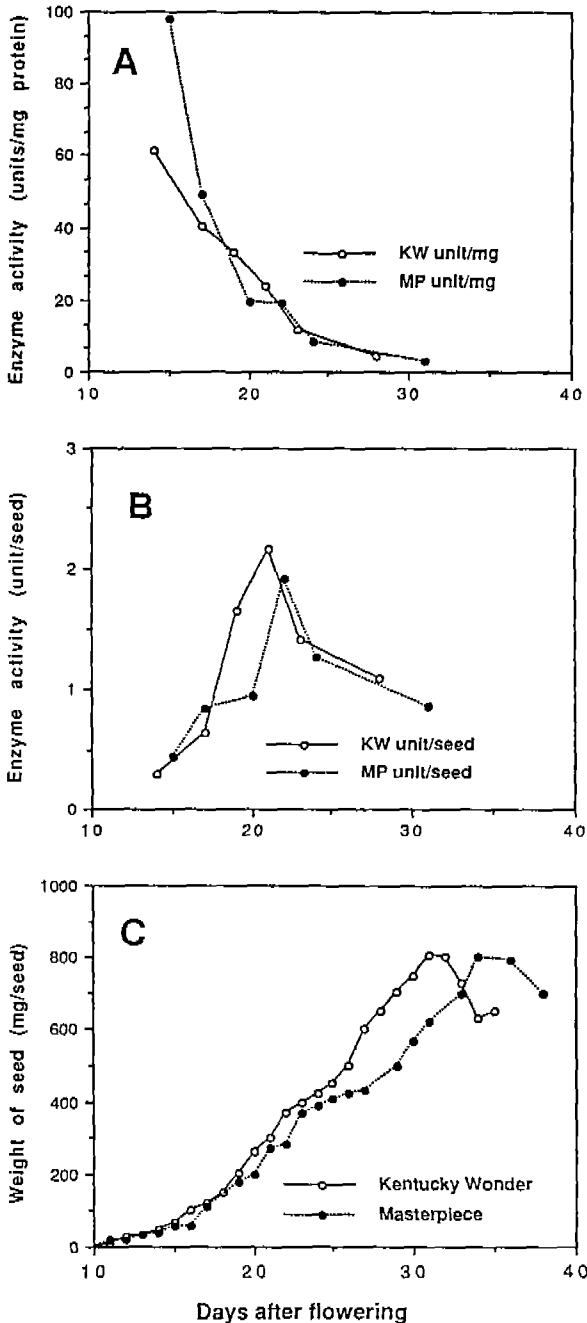


Fig. 2. Changes in the activity of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase converting [2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub> to GA<sub>1</sub> during seed maturation of two cultivars, Kentucky Wonder (KW, normal) and Masterpiece (MP, dwarf) of *Phaseolus vulgaris*. A, The 3 $\beta$ -hydroxylase activity per mg protein; B, The 3 $\beta$ -hydroxylase activity per seed; C, Growth curves of seeds of *P. vulgaris*.

piece의 생장곡선은 거의 같은 양상을 보였다. 기존의 보고와 같이 개화 후 20일과 30일 전후의 왕성한 종자생장기 사이에, 개화 후 25일 전후하여 단기간의 완만한 성장(lag phase)기간이 존재하였다(Carr and Skene, 1961).

**3 $\beta$ -수산화효소의 부분정제.** 조효소액에 냉각 메탄올을 15% 농도가 되도록 첨가한 후, 원심분리하여 침전단백질을 제거하였다. 이 단계에서 총단백질중 20-30%의 단백질을 제거할 수 있었으며 3 $\beta$ -수산화효소 활성의 회수율은 약 90%로 효소의 정제도를 약 1.2배 높일 수 있었다(자세한 데이터는 제시하지 않았음)(Kwak, 1988). 또한 Butyl-Toyoparl을 이용한 소수성 컬럼크로마토그래피(Fig. 3)에서와 같이 효율적으로 3 $\beta$ -수산화효소를 정제할 수 있었다. 이때 3 $\beta$ -수산화효소의 활성의 회수율은 약 30%이었으며, 단백질은 조효소액중의 총단백질의 약 1/20까지 줄일 수 있어 효소의 정제도를 약 6배 높일 수 있었다.

**종자성숙에 따른 3 $\beta$ -수산화효소 활성.** 강낭콩(정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece) 미성숙 종자의 각 성장단계로부터 부분 정제한 3 $\beta$ -수산화효소의 조효소액을 사용하여 3 $\beta$ -수산화효소 활성의 변화를 조사하였다. Fig. 2A, B에서와 같이 정상종과 왜성종의 두 품종의 종자성숙에 따른 효소활성은 거의 같았다. 단위 단백질당의 효소활성은 종자가 미성숙할수록 더 높은 효소 활성을 보였으며 종자가 성숙함에 따라 현저히 저하하였다. 한편 종자 한개당의 효소활성은 종자가 성숙함에 따라 증가하여 개화 후 21일 전후에서 가장 높은 활성을 보였다. 그러나 종자가 더욱 성숙함에 따라 활성은 현저히 저하하였다.

**[17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>의 대사실험.** Kentucky Wonder의 성숙단계가 다른 성장단계로부터 부분 정제한 3 $\beta$ -수산화효소의 각 3 unit의 효소를 사용하여 [17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>]GA<sub>20</sub>의 대사를 조사하였다. GA<sub>20</sub>은 GA<sub>1</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub>으로 효율적으로 변환되었으며, GA<sub>1</sub>이 주 대사산물이며 종자생장의 관계 없이 GA<sub>20</sub>으로부터 GA<sub>1</sub>(55-70%), GA<sub>5</sub>(17-21%), GA<sub>6</sub>(4-11%)의 변환율이 거의 일정하였다(Fig. 4).

**각종 GA 및 GA유도체가 GA<sub>5</sub>의 epoxidation에 미치는 영향.** 조사한 13종의 GA와 3종의 GA유도체 중에서 GA<sub>5</sub>로부터 GA<sub>6</sub>의 epoxidation반응에 억제효과를 나타낸 것은 GA<sub>5</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>13</sub>, GA<sub>30</sub>, GA<sub>41</sub>이었다. 억제효과를 나타낸 GA 중에서 7위치의 탄소가 메틸화된 것들 중에서 GA<sub>9</sub>-Me와 GA<sub>20</sub>-Me은 억제효과가 없었다(Table 1).

고찰

**3 $\beta$ -수산화효소의 부분정제.** 강낭콩 미성숙 종자로부터 조제한 3 $\beta$ -수산화효소의 조효소액으로부터 20% 메탄올 침전과 Butyl-Toyoparl 컬럼에 의한 소수성 크로마토그

Table 1. Effects of non-labelled GA and GA derivatives on the epoxidation of GA<sub>5</sub> to GA<sub>6</sub>

| Gibberellins*          | Inhibition of epoxidase activity** |
|------------------------|------------------------------------|
| GA <sub>1</sub>        | 0                                  |
| GA <sub>3</sub>        | 0                                  |
| GA <sub>4</sub>        | 0                                  |
| GA <sub>5</sub>        | 68                                 |
| GA <sub>8</sub>        | 0                                  |
| GA <sub>9</sub>        | 36                                 |
| GA <sub>12</sub>       | 0                                  |
| GA <sub>15</sub>       | 46                                 |
| GA <sub>19</sub>       | 0                                  |
| GA <sub>20</sub>       | 73                                 |
| GA <sub>22</sub>       | 0                                  |
| GA <sub>24</sub>       | 0                                  |
| GA <sub>29</sub>       | 0                                  |
| GA <sub>44</sub>       | 31                                 |
| GA <sub>53</sub>       | 0                                  |
| GA <sub>9</sub> -Me*** | 0                                  |
| GA <sub>20</sub> -Me   | 0                                  |
| GA <sub>24</sub> -Me   | 0                                  |

\*The concentration of gibberellins used in the reactions was  $1 \times 10^{-5}$  M. \*\* [<sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub> (500 Bq,  $1.66 \times 10^{-6}$  M) was incubated with partially purified 3β-hydroxylase (8.5 μg protein), Fe<sup>2+</sup> (0.5 mM), 2-oxoglutarate (5 mM) and ascorbate (5 mM) for 2 hr at 30°C. Production of GA<sub>6</sub> was 124 Bq in control incubation. Inhibition % = 100 - (enzyme activity with non-labelled GA/enzyme activity of control) × 100. \*\*\*Me = methyl ester at C-7.

래피로 3β-수산화효소를 효율적으로 부분 정제할 수 있었다. 20% 메탄올 침전법은 효소정제의 초기단계에서 종자 종의 저장단백질 등을 제거할 수 있는 방법으로 종자가 어느정도 성숙한 단계에서 조제한 효소액에 효과적이었다 (Kwak 1988). 더우기 다음 단계의 정제법인 컬럼크로마토그래피의 컬럼의 부하를 줄일 수 있는 잇점도 있었다.

Fig. 2에서와 같이 Butyl-Toyopearl 컬럼에 의한 소수성 크로마토그래피로 3β-수산화효소를 효율적으로 정제할 수 있었을 뿐 아니라 내생 GA와 종자성숙에 따른 GA 생합성 저해물질 등의 소수성 저분자를 제거할 수 있었다(Kwak et al., 1988d). 포화유안의 농도가 0%일 때 3β-수산화효소가 용출된 것으로 보아, 이 효소는 친수성이 매우 높다고 추측된다.

GA 3β-수산화효소는 2가철과 2-oxoglutarate를 요구하는 산소첨가효소[EC. 1.14.11.-]로 대단히 불안정하여 저자들도 초기실험에서는 정제가 거의 불가능하였으나, 효소정제 중의 효소활성을 안정화시키기 위하여 안정화제로 30% glycerol, 0.2 M sucrose, 2 mM DTT를 완충액에 첨가하여

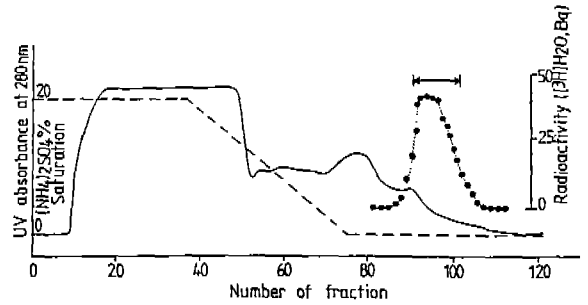


Fig. 3. Typical Butyl-Toyopearl elution profile. Methanol precipitation preparations were applied to the column and eluant was collected in 5-ml fractions, of which 50 μl each was assayed for the 3β-hydroxylase activity. The chromatographic conditions were described in Materials and Methods. --●-- enzyme activity; — protein elution profile (UV at 280 nm); ----- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gradient.

효소의 불활성화를 줄일 수 있었다(Hashimoto and Yamada, 1987, Kwak et al., 1988b).

**종자성숙에 따른 3β-수산화효소의 활성.** Fig. 2A, B는 Butyl-Toyopearl 컬럼에 의해 정제된 효소를 사용하여 미성숙종자의 성숙에 따른 단위 단백질 및 종자 한계당의 GA 3β-수산화효소 활성의 변화를 나타낸 것으로, 정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece의 미성숙종자에서 종자성숙에 따른 GA 3β-수산화효소의 활성의 변화와 강약에는 차가 없음을 나타내었다. 종자가 미성숙할수록 단위 단백질당의 활성이 높아졌으며 종자성숙에 따라 효소활성은 현저히 저하하였다. 이러한 이유로 3β-수산화효소의 정제에는 단위 단백질당 효소활성이 높고 단기간에 개화하여 일시에 미숙종자를 대량으로 채취 가능한 Masterpiece의 개화 후 13일 전후의 종자를 사용하여 이 효소를 정제하였다(Kwak et al., 1988b).

Kentucky Wonder의 종자성숙에 따른 단위 종자에 대한 3β-수산화효소 활성의 변화는 3β-위치의 수산기를 가진 내생 GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>의 함량변화와 거의 같은 변화를 보였다 (Kwak et al., 1998a). 또한 Endo 등(1989)은 정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece의 경엽부에서의 내생 GA를 분석한 결과, 두 품종간에는 내생 GA의 종류와 함량에서도 차이가 없음을 확인하였으며, 강낭콩의 경엽부 신장에는 벼, 옥수수에서와 같이 GA<sub>1</sub>이 절간신장제어에 중요한 역할을 하는 내생 GA임을 제시하였다. 강낭콩의 내생 GA와 미숙종자의 3β-수산화효소 활성이 정상종과 왜성종에서 차이가 없으므로, Masterpiece의 왜성발현에는 반드시 내생 GA 함량에 의한 것이 아니라 기타의 원인에 의한 GA의 활성발현이 제어된다고 여겨진다. 이와 비슷한 왜성발현은 옥수수의 왜성종 D8에서는 정상종보다 다량의

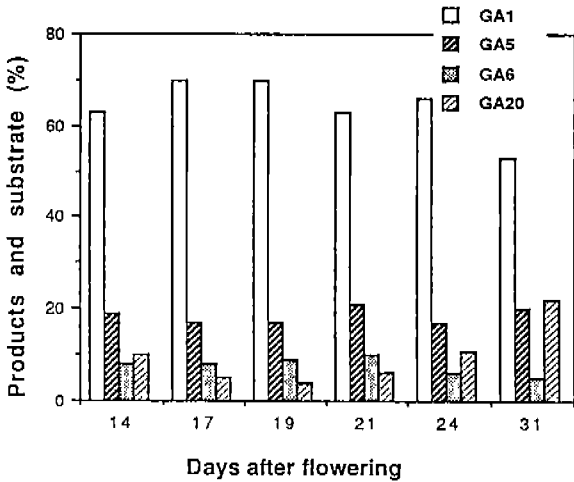


Fig. 4. Conversion of  $[17-^{13}\text{C}, ^3\text{H}_2]\text{GA}_{20}$  to  $\text{GA}_1$ ,  $\text{GA}_5$ , and  $\text{GA}_6$  by partially purified preparations from seeds of different ages of *Phaseolus vulgaris*. Products were injected onto a Nucleosil 5C<sub>18</sub> column (4.6×100 mm) and eluted with a 32-min linear gradient of 19% methanol to 46% methanol in 0.05% acetic acid at a flow rate of 1 ml/min. The retention times (min) of  $\text{GA}_1$ ,  $\text{GA}_5$ ,  $\text{GA}_6$  and  $\text{GA}_{20}$  were 18.5, 30.0, 22.0 and 32.5, respectively. The eluant was collected in 1 ml (1-29 min) and 0.5 ml (29.5-40 min) and analyzed by a liquid scintillation counter. For the separation of  $\text{GA}_5$  and  $\text{GA}_{20}$ , a Nucleosil 5N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> column (4.6×100 mm) was used.

$\text{GA}_1$  및 관련 GA를 함유하고 있어 D8의 왜성발현은 GA 분자의 수용 또는 수용 후에 시작되는 일련의 발현과정중의

이상에 의한 것이라 여겨진다(Fujioka et al., 1988).

[ $17-^{13}\text{C}, ^3\text{H}_2$ ] $\text{GA}_{20}$ 의 대사. 각 성장단계로부터 부분 정제한 3β-수산화효소의 동일량(3 unit)의 효소를 사용하여 [ $17-^{13}\text{C}, ^3\text{H}_2$ ] $\text{GA}_{20}$ 의 대사를 조사한 결과,  $\text{GA}_{20}$ 은  $\text{GA}_1$ ,  $\text{GA}_5$ ,  $\text{GA}_6$ 으로 효율적으로 변환되었으며, 종자성장단계에 관계 없이  $\text{GA}_{20}$ 으로부터  $\text{GA}_1$ ,  $\text{GA}_5$ ,  $\text{GA}_6$ 의 변환율이 거의 일정 하였다. 한편  $\text{GA}_5$ 는 부분 정제한 3β-수산화효소 분획에 의해  $\text{GA}_6$ 로 효율적으로 변환되었다(Kwak et al., 1988c; Kobayashi et al., 1991). [ $17-^{13}\text{C}, ^3\text{H}_2$ ] $\text{GA}_5$ 로부터  $\text{GA}_6$ 의 epoxidation에는  $\text{GA}_{20}$ 으로부터  $\text{GA}_1$ 의 3β-수산화효소의 기질인  $\text{GA}_5$ ,  $\text{GA}_9$ ,  $\text{GA}_{15}$ ,  $\text{GA}_{20}$ ,  $\text{GA}_{44}$ 에 의해 특이적으로 저해를 받았다(Table 1) (Kwak et al., 1988c). 또한  $\text{GA}_5$ 의 epoxidation은  $\text{GA}_{20}$ 의 3β-수산화반응과 같이 2가 철과 2-oxoglutarate, ascorbate를 요구하는 산소첨가효소이다(Kobayashi et al., 1991). 이상의 결과는  $\text{GA}_{20}$ 의 3β-수산화반응과  $\text{GA}_5$ 의 epoxidation은 동일효소에 의해 촉매됨을 시사한다. 이로써 강낭콩 미성숙종자에서  $\text{GA}_{20}$ 의 대사는  $\text{GA}_5$ 를 거쳐  $\text{GA}_6$ 로 가는 경로와  $\text{GA}_1$ 을 거쳐  $\text{GA}_6$ 으로 가는 경로가 존재함이 밝혀졌다(Fig. 5).

적 요

강낭콩의 두 품종(정상종인 Kentucky Wonder와 왜성종인 Masterpiece)의 미성숙 종자로부터 부분 정제한 GA 3β-수산화효소를 사용하여 [ $^3\text{H}$ ] $\text{GA}_{20}$ 으로부터  $\text{GA}_1$ 로의 효소활성의 변화를 조사하였다. 두 품종의 종자성숙에 따른 3β 수산화효소 활성의 변화와 강약에는 차이가 없었다. 극히 미성숙한 종자에서 단위 단백질당 GA 3β-수산화효소 활성이 가장 높았다. 단위 종자당 효소의 비활성은 개화

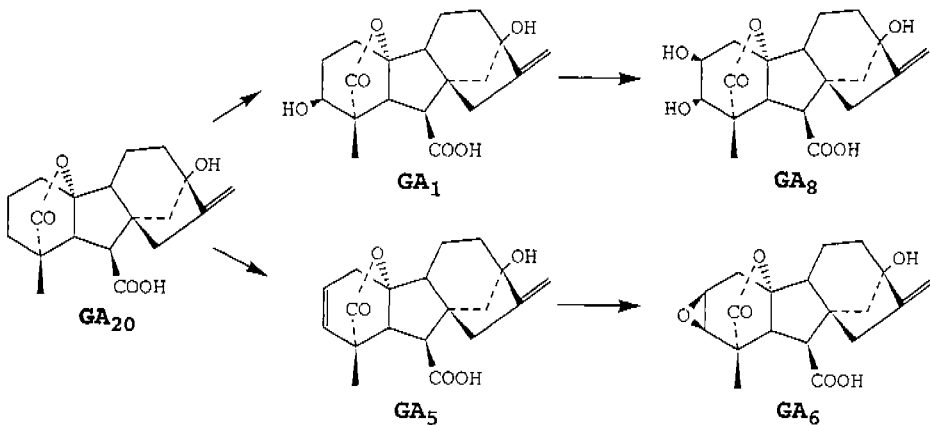


Fig. 5. Biosynthetic pathways from  $\text{GA}_{20}$  to  $\text{GA}_6$  and  $\text{GA}_8$ . 3β-Hydroxylation of  $\text{GA}_{20}$  to  $\text{GA}_1$  and epoxidation of  $\text{GA}_5$  to  $\text{GA}_6$  are catalyzed by the same preparation. Metabolism of  $\text{GA}_1$  to  $\text{GA}_8$  is catalyzed by a separable 2-oxoglutarate-dependent GA 2β-hydroxylase (Smith and MacMillan, 1984).

후 21일 전후에서 최대치를 나타내었으며, 종자가 더욱 성숙함에 따라 활성은 감소하였다. 동일량의 3β-수산화효소 활성을 사용하여 [17-<sup>13</sup>C, <sup>3</sup>H<sub>2</sub>] GA<sub>20</sub>의 대사를 조사한 결과, GA<sub>1</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub>으로의 변환율은 종자생장단계에 관계 없이 거의 일정하였다. GA<sub>5</sub>로부터 GA<sub>6</sub>의 epoxidation은 정제된 3β-수산화효소분획에 이루어졌으며(Kobayashi *et al.*, 1991), 이 반응은 3β-수산화효소의 기질들만에 의해 특이적으로 억제되었다. 이러한 결과는 강낭콩 미성숙종자에서 GA<sub>20</sub>의 3β-수산화반응과 GA<sub>5</sub>의 epoxidation은 동일 효소에 의해 촉매됨을 시사한다.

사 사

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

참 고 문 헌

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Carr, D.J. and K.G.M. Skene. 1961. Diauxic growth curves of seeds, with special reference to French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Aust. J. Biol. Sci.* **14**: 1-12.

Durley, R.C., J. MacMillan and R.J. Pryce. 1971. Investigation of gibberellins and other growth substances in the seeds of *Phaseolus multiflorus* and of *Phaseolus vulgaris* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry* **10**: 1891-1908.

Endo, K., H. Yamane, M. Nakayama, I. Yamaguchi, N. Murofushi, N. Takahashi and M. Katumi. 1989. Endogenous gibberellins in the vegetative shoots of tall and dwarf cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* **30**: 137-142.

Fujioka, S., H. Yamane, C.R. Spray, M. Katsumi, B.O. Phinney, P. Gaskin, J. MacMillan and N. Takahashi. 1988. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9031-9035.

Graebe, J.E. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 419-465.

Hashimoto, T. and Y. Yamada. 1987. Purification and characterizaion of hyoscyamine 6β-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Eur. J. Biochem.* **164**: 277-285.

Ingram, T.J., J.B. Reid, P. Gaskin, C.L. Willis and J. MacMil-

lan. 1984. Internode length in *Pisum*. The *Le* gene controls the 3β-hydroxylation of gibberellin A<sub>20</sub> to gibberellin A<sub>1</sub>. *Planta* **160**: 455-463.

Kamiya, Y. and J.E. Graebe. 1983. The biosynthesis of all major pea gibberellins in a cell-free system from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **22**: 681-689.

Kobayashi, M., S.S. Kwak, Y. Kamiya, H. Yamane, N. Takahashi and A. Sakurai. 1991. Conversion of GA<sub>5</sub> to GA<sub>6</sub> and GA3 in cell-free systems from *Phaseolus vulgaris* and *Oryza sativa*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 249-251.

Kwak, S.S. 1988. Chemical and biochemical studies on gibberellin biosynthesis enzymes in the higher plants. Ph. D. thesis. The Univ. of Tokyo. Japan. 167 pp.

Kwak, S.S., Y. Kamiya, M. Takahashi, A. Sakurai and N. Takahashi. 1988a. Metabolism of [<sup>14</sup>C]GA<sub>20</sub> in a cell-free systems from developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* **29**: 707-711.

Kwak, S.S., Y. Kamiya, A. Sakurai, N. Takahashi and J.R. Graebe. 1988b. Partial purification and characterization of gibberellin 3β-hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* **29**: 935-943.

Kwak, S.S., Y. Kamiya, H. Yamane, A. Sakurai, J.E. Graebe, B.O. Phinney and N. Takahashi. 1988c. Epoxidation of gibberellin A<sub>5</sub> to A<sub>6</sub> by partially purified gibberellin 3β-hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. In, Proceedings of 13th International Conference on Plant Growth Substances, Calgary, Canada. Abst. 346.

Kwak, S.S., Y. Kamiya, A. Sakurai and N. Takahashi. 1988d. Isolation of a gibberellin biosynthesis inhibitor from testas of *Phaseolus vulgaris* L. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 149-151.

Murakami, Y. 1972. Dwarfing gene in rice and their relation to gibberellin biosynthesis. In, Plant Growth Substances 1970, D.J. Carr (ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 166-174.

Murofushi, N., R.C. Durley and R.P. Pharis. 1977. Preparation of radioactive gibberellins A<sub>20</sub>, A<sub>5</sub> and A<sub>8</sub>. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1075-1079.

Smith, V.A. and J. MacMillan. 1984. Purification and partial characterization of gibberellin 2β-hydroxylase from *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Growth Regul.* **2**: 251-264.

Spray, C., B.O. Phinney, P. Gaskin, S.J. Gilmour and J. MacMillan. 1984. Internode length in *Zea mays* L. The dwarf-1 mutation controls the 3β-hydroxylation of gibberellin A<sub>20</sub> to gibberellin A<sub>1</sub>. *Planta* **160**: 464-468.

Takahashi, M., Y. Kamiya, N. Takahashi and J.E. Graebe. 1986. Metabolism of gibberellins in a cell-free system from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **168**: 190-199.