

콩으로부터 상처 유도 beta-amyrin synthase 유전자의 동정 및 발현분석

박성환 · 이재현*
동아대학교 생명자원과학부

Molecular Cloning and Characterization of Wound-inducible Beta-amyrin Synthase from Soybean

PARK, Seong-Whan · LEE, Jai-Heon*

Faculty of Natural Resources and Life science, Dong-A university, 840, Hadan-2 dong, Saha-gu, 604-714, Busan

ABSTRACT Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to isolate wound-induced cDNAs from wounded soybean. One of wound-induced cDNA, *gmwi33* showed high homology with genes encoding β -amyrin synthase. The full length cDNA of *gmwi33*, designated GmAMS1, is 2416 bp long and contains an open reading frame consisted of 739 amino acids. GmAMS1 protein showed 89% identity with licorice GgbAS1 and 86% identity with pea OSCPSY. In 5 day-old, dark-grown seedlings, the expression of GmAMS1 was most strongly induced by light and weakly induced by methyl jasmonate and by low temperature. However, GmAMS1 was not induced by elicitor or UV-B treatment. Such expression pattern might be closely related with the oxygen-radical scavenging activity of soyasaponin.

Key words: Light-inducible, saponins, suppression subtractive hybridization, triterpene biosynthesis

서 론

한반도를 비롯한 만주일대가 원산지인 콩은 우수한 식물성 단백질원으로서 식용 또는 사료로 널리 이용되어 왔다. 콩은 양질의 단백질과 지질 및 우수한 영양성분 외에도 이소플라본, 피틴산, 사포닌, protease inhibitors, 올리고당, 레시틴, 페놀 화합물 등과 같은 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 다량 함유하고 있어 (Messina et al. 1994; Hendrich et al. 1994), 건강기능성 작물로서의 가치를 인정받고 있다. 콩이 함유한 이차대사산물의 하나인 사포닌은 콩 건조중량의 0.1~0.5%를 차지하며 (Anderson and Wolf, 1995), 항암 기능 (Oh and Sung 2001), 활성산소 제거 기능 (Okubo and Yoshiki 2000), 항바이러스 기능 (Nakashima et al. 1989) 등 유용한 생리활성을 가진 것으로 보고되었다. 하지만, 이러한 사포닌의 중요한 효능이 잘 알려졌음에도 불구하고, 아직까지 콩 사포닌의 합성 및 축

적기작에 대한 분자생물학적 연구는 진행된 바가 없는 실정이다.

콩 사포닌은 triterpene 기본구조에 여러 분자의 당이 결합된 배당체 형태로 존재하며, 그 어글리콘의 형태에 따라 A, B 또는 E형으로 분류된다 (Shiraiwa et al. 1991). 이들 어글리콘은 oleanane형 triterpene인 β -amyrin과 동일한 고리구조를 하고 있어 (Figure 1), β -amyrin의 수산화에 의해 파생된 유도체들이라 할수 있다. Triterpene의 생합성은 30개의 탄소로 구성된 2,3-oxidosqualene의 고리화반응으로 완결되는데, 이 반응은 triterpene과 스테롤 합성에 있어 결정적인 단계로서 oxidosqualene cyclase (OSC)라는 효소에 의해 촉매된다 (Abe et al 1993). OSC는 합성해내는 triterpene 또는 스테롤의 종류에 따라 β -amyrin synthase, lupeol synthase, cycloartenol synthase, lanosterol synthase 등으로 분류된다.

지금까지 보고된 β -amyrin synthase 유전자는 인삼의 PNY와 PNY2 (Kushiro et al. 1998a; Kushiro et al. 1998b), 감초의 GgbAS1 (Hayashi et al. 2001), 완두콩의 PSY (Morita et al. 2000) 등이 있다. β -amyrin synthase 외의 OSC 유전자로 lupeol

*Corresponding author Tel 051-200-7592 Fax 051-200-6993
E-mail jhnlee@mail.donga.ac.kr

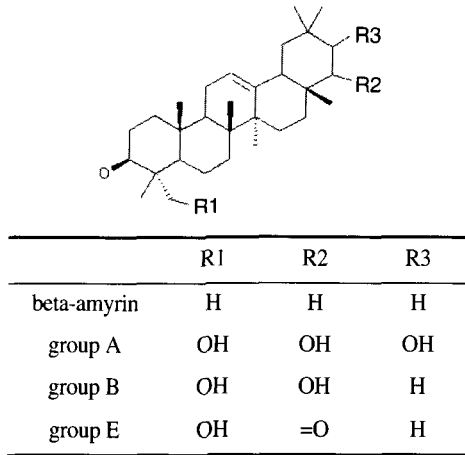


Figure 1. The structure of β -amyrin and aglycones of soyasaponins.

synthase (Herrera et al. 1998), cycloartenol synthase (Corey et al. 1993, Kushiro et al. 1998a), lanosterol synthase (Buntel and Griffin 1992, Shi et al. 1994, Abe and Prestwich 1995) 등이 연구되었다. 특별한 예로, 한 종류가 아닌 여러 종류의 triterpene 합성을 촉매하는 OSC 유전자도 보고되었는데, 애기장대의 ATLUP2는 β -amyrin뿐 아니라 lupeol, α -amyrin도 일정비율로 합성하는 것으로 알려졌으며 (Husselstein et al. 2001), 완두콩의 PSM은 α -amyrin과 β -amyrin을 합성하는 mixed-amyrin synthase로 알려졌다 (Morita et al. 2000).

사포닌 및 triterpene의 생물학적 기능에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만, 병 저항성에 관여하는 항균성분으로 인식되고 있다. 사포닌을 합성하지 못하는 돌연변이 귀리 식물체의 경우 병원성 곰팡이균에 대한 저항성이 현저히 저하된 것으로 조사되어 (Papadopoulou et al. 1999), 귀리 식물체 내의 사포닌이 항균작용을 하는 antimicrobial phyto protectant의 기능을 할 것으로 제안되었다. 또한, 식물세포 현탁배양에서 triterpene의 합성이 elicitor 처리에 의해 증가된다는 조사 결과로서, triterpene이 곰팡이 저항성과 밀접한 관계가 있음을 추정할 수 있다 (van der Heijden et al. 1989). 본 연구에서는 대부분의 병저항성 관련 유전자들은 상처에 의해 그 발현이 유도된다는 사실을 토대로, 콩식물에서 상처에 의해 유도되는 유전자들을 suppression subtractive hybridization (SSH)라는 방법을 이용하여 동정하였다. 그 중 β -amyrin synthase와 높은 상동성을 보이는 클론을 선별하여, full-length cDNA 클론을 분리하고 유전자의 특성 및 발현양상을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

공시재료는 *Glycin max* 신평달 2호 품종으로서, 비닐하우스에서 3주간 키운 식물체를 항온 (25°C) 배양실에서 일주일동

안 키운 후 실험에 사용하였다. 상처처리는 펀칭기로 지름 5 mm의 구멍을 일당 2~3개씩 내는 방법으로 수행하였다. 상처 처리한 식물체로부터, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 후에 각각 잎을 채취하여 RNA 추출 전까지 -75°C에서 보관하였다. GmAMS1의 northern 분석을 위해서는 신평달 2호 종자를 발아시켜 25°C 암조건에서 5일간 배양한 seedling을 재료로 이용하였다.

Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

앞으로부터의 RNA 분리는 Verwoerd 등 (1988)의 방법을 변형하여 수행하였고, RNA로부터 mRNA 분리는 oligotexTM mRNA isolation kit (Qiagen, USA)를 이용하였다. 상처처리한 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 후에 채취한 잎에서 추출한 total RNA를 하나로 합쳐 그로부터 mRNA를 분리하였다. 이 mRNA로부터 합성한 cDNA를 tester로 하고, 아무런 처리도 하지 않은 식물체의 mRNA로부터 합성한 cDNA를 driver로 하여 SSH를 수행하였다. SSH는 PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech, USA)를 이용하여 kit에 제공된 방법에 따라 수행하였다. Advatage-2 PCR kit (Clontech, USA)를 이용하여 subtracted cDNA를 증폭하였으며, PCR 증폭된 cDNA는 original TA cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝하였다.

염기서열 분석

DNA 염기서열은 ALFexpress (AP biotech) 시스템을 이용하여 결정하였으며, 결정된 염기서열은 PCGENE (Intelli Genetics, Inc., Release 6.60) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 단백질서열의 비교 및 유연관계 분석에는 ClustalX (version 1.81) 프로그램을 이용하였고, Treeview (version 1.6.6)을 이용하여 계통도를 그렸다.

RACE (rapid amplification of cDNA ends)

SSH로부터 얻은 β -amyrin synthase cDNA 단편의 염기서열을 기초로 oligonucleotide를 제작하고, SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech, USA)를 이용하여 5'-말단과 3'-말단의 cDNA를 증폭하였다. 증폭된 cDNA는 pCR2.1 vector (Invitrogen, USA)에 클로닝하고 그 염기서열을 결정하였다. RACE에 사용된 oligonucleotides의 염기서열은 GGACTAATTCATGCTGGACAGGCGG (3'-RACE)와 ACTTCAGTGGAGGCAATGGAACCC (5'-RACE)이다.

Southern 분석

콩식물의 어린잎으로부터 Shure 등 (1983)의 방법으로 게놈

DNA를 추출하였고, 10 µg DNA를 *EcoRI*, *HindIII*, 또는 *XbaI* 등의 제한효소로 절단하였다. 절단된 DNA는 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, Sambrook과 Russell (2000)의 방법에 따라 nylon membrane에 고정시켰다. Probe DNA는 Ladderman™ labeling kit (TaKaRa)를 이용하여 [α -³²P]dCTP로 방사선 표지하였다. Hybridization은 Church와 Gilbert (1984)의 방법에 따라 수행하였으며, hybridization을 마친 필터는 2×SSC / 0.1% SDS 용액으로 상온에서 두 번 세척하고 0.1×SSC / 0.1% SDS 용액으로 상온에서 한 번, 68°C에서 한 번 세척하였다.

Northern 분석

GmAMS1의 발현을 조사하기 위해 암조건에서 5일간 발아시킨 콩나물을 서로 다른 조건으로 6시간 처리한 후에 배측에서 RNA를 추출하였다. 각 샘플로부터 분리한 20 µg의 RNA를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 고정시켰다. Probe DNA 준비와 hybridization, 필터의 세척은 기본적으로 Southern 분석과 동일한 방법으로 수행하였다.

결과 및 고찰

SSH를 이용한 βamylin synthase cDNA의 동정 및 전체 유전자 확보

상처를 준 앞에서 준비한 cDNA를 tester DNA로 하고, 상처를 주지 않은 cDNA를 driver DNA로 하여 SSH를 수행하였고, 이를 통해 얻어진 subtracted cDNA를 플라스미드 벡터에 클로닝하였다. SSH를 이용하여 분리한 cDNA들의 염기서열을 분석해본 결과, 그 중 하나인 *gmwi33* 클론이 감초 (*Glycyrrhiza glabra*)의 GgbAS1 유전자 (Genbank accession no. AB037203)와 96%의 유사성을 보이는 것으로 나타났다. GgbAS1 유전자는 βamylin synthase를 암호화하는 유전자로서 감초의 glycyrrhizin과 soyasaponin 합성에 관여할 것으로 알려졌다 (Hayashi et al. 2001). *gmwi33* cDNA는 GgbAS1 외에도 완두와 인삼의 βamylin synthase 유전자와도 역시 높은 상동성을 보였다. 그러나, 대부분의 SSH클론은 작은 유전자 단편만을 가지고 있기 때문에, cDNA library 또는 mRNA로부터 전장 cDNA 유전자를 확보하여야 한다. *gmwi33* cDNA 역시 βamylin synthase 유전자의 320 bp 단편만을 가지고 있었다.

*gmwi33*의 전장 유전자를 확보하기 위해 RACE PCR방법을 이용하였다. 상처를 준 앞에서 준비한 mRNA를 cDNA로 전환시킨 다음, *gmwi33* 염기서열을 기초로 제작한 oligonucleotide primer와 cDNA 양말단에 결합하는 universal primer를 이용하여 전체유전자를 증폭하였다. RACE PCR 결과, 2.2 kb (5')와 0.5 kb (3')의 증폭밴드를 얻었고, 이들을 플라스미드

벡터에 클로닝한 후 GmAMS1이라 명명한 유전자의 전체 염기서열을 결정하였다. GmAMS1은 총 2416 bp로 이루어져 있으며, 개시코돈과 종결코돈을 제대로 갖춘 단일한 open reading frame (ORF)을 포함하고 있었다. 그 ORF로부터 파생되는 단백질은 739개의 아미노산으로 구성되며 약 84 KDa 크기를 가질 것으로 예상되었다.

GmAMS1과 다른 OSC 유전자의 아미노산 서열 비교

GmAMS1은 다른 작물에서 분리된 βamylin synthase와 아미노산 서열에서 70% 이상의 높은 유사성을 나타내었다 (Figure 2). 특히 감초의 GgbAS1과는 89%, 완두의 PSY와는 86%의 높은 유사성을 보였고, 인삼의 PNY와 PNY2와는 다소 낮은 76%, 74%의 유사성을 보였다. 다른 OSC 단백질과 마찬가지로, 모든 βamylin synthase에서 DCTAE motif (Abe and Prestwich 1994)와 QW motif (Poralla et al. 1994) 주변의 아미노산 서열이 잘 보존되어 있었다. DCTAE motif의 aspartic acid 잔기는 cyclase 효소활성에 필수적이며 고리화반응의 마지막 단계에서 파생되는 양이온 탄소를 안정화시키는 역할을 할 것으로 제안되었다. GmAMS1이 다른 βamylin synthase와 눈에 띄게 다른 점은 253번 아미노산 위치에서 23개의 아미노산 잔기가 결실되었다는 사실이다. 다른 어떤 OSC 유전자에서도 이러한 형태의 결실은 발견되지 않았기

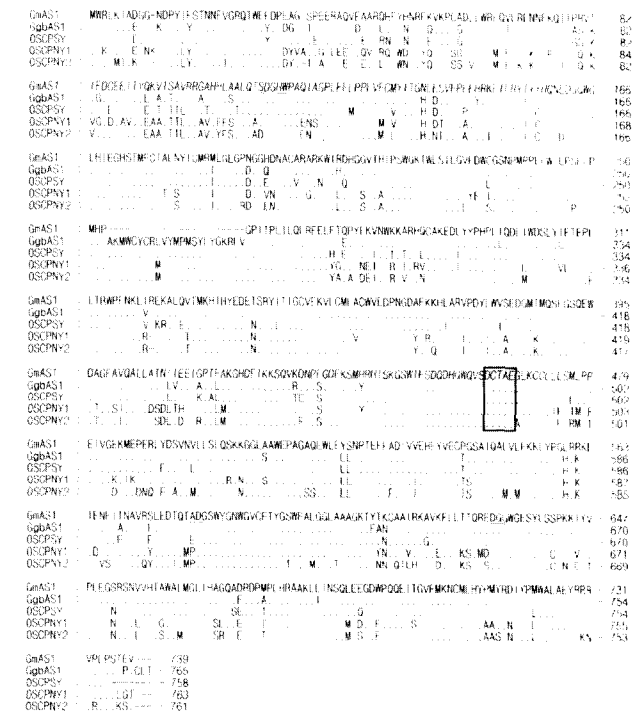


Figure 2. Amino acid alignment of GmAMS1 protein sequence (Genbank accession number AY095999) with β-amylin synthases from licorice (GgbAS1, AB037203), pea (OSCPsy, AB034802), and ginseng (OSCPNY1, AB009030; OSCPNY2, AB014057). The boxed sequence indicates DCTAE motif and the underlined sequences indicate QW motif. Residues identical to the top sequence are replaced by dots.

때문에, 23개 아미노산의 결실은 콩 유전자에서만 보이는 특징으로 보인다.

GmAMS1이 β -amyrin synthase와 mixed amyrin synthase (완두의 PSM)과는 높은 유사성을 보이는 데 비해, lupeol synthase나 cycloartenol synthase 등 다른 OSC 단백질과는 상대적으로 낮은 유사성을 보였다. OSC 단백질 간의 유연관계를 분석해본 결과, GmAMS1과 β -amyrin synthase 단백질들이 계통학적으로 같은 위치에 있다는 점을 확인 할 수 있었다 (Figure 3). 동물의 lanosterol synthase는 식물 단백질들과는 거리가 멀리 떨어져 있으며, cycloartenol synthase는 다른 식물 단백질에 비해 lanosterol synthase와 가까운 위치를 차지하고 있다. 이러한 점들은 단백질서열에 의한 계통학적 분류가 단백질의 효소적 기능에 의한 분류와 잘 일치하고 있음을 보여 준다.

Southern 분석 및 northern 분석

GmAMS1 유전자의 Southern 분석을 수행한 결과, *EcoRI*과 *HindIII*로 절단한 시료에서 하나의 진한 band와 함께 희미한 여러 개의 band를 볼 수 있었다 (Figure 4). 하나의 진한 band로 보아 GmAMS1 유전자가 게놈 내에 단일 copy로 존재하

는 것으로 보여지며, 희미한 여러 band는 β -amyrin synthase가 아닌 다른 OSC 유전자, 즉 cycloartenol synthase 유전자들에 의한 것으로 추정된다. *XbaI*으로 절단한 시료에서는 두 개의 진한 band를 확인할 수 있었는데, 이는 염색체상의 같은 유전자좌에서 restriction fragment length polymorphism이 존재하기 때문인 것으로 추정된다.

GmAMS1의 발현이 어떠한 스트레스에 의해 유도되는지를 살펴보기 위해 암조건에서 일주일간 키운 콩나물에서 northern 분석을 수행하였다 (Figure 5). 그 결과, GmAMS1은 빛에 의해 가장 강하게 발현이 유도되며, 저온처리와 methyl jasmonate에 의해서도 발현이 유도됨을 확인하였다. GmAMS1이 상처처리한 cDNA에서 분리한 유전자이기 때문에, 상처 신호전달에 관여하는 methyl jasmonate에 의해서 발현이 유도되는 것은 당연한 결과로 보여지나, 빛에 의해 가장 강하게 유도된다는 사실은 예상밖의 결과였다. Papadopoulou 등 (1999)의 연구에서 사포닌이 귀리의 병원성 곰팡이균에 대한 저항성에 관여한다고 보고하였으나, GmAMS1은 elicitor에 의해 발현이 거의 증가하지 않는 것으로 나타났다. 이는 elicitor로 사용한 효모추출물이 콩나물에서 병원성 반응을 유도하지 못하기 때문일 가능성이 있고, 또 다른 측면으로는 콩나물에서는 사포닌이 antimicrobial phytoprotectant로서 작용하기보다는 다른 세포 내 기능을 가질 가능성이 있다. Okubo와 Yoshiki (1996, 2000)의 연구에서 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP) 접합 사포닌이 활성산소를 제거하는 역할을 한다고 하였다. 빛에 의해 GmAMS1의 발현이 강하게 유도되는 것이 이러한 사포닌의 활성산소 제거 기능과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다. 저온에 의한 GmAMS1의 발현 유도 역시 저온처리가 식물세포에 산화스트레스를 유발하는 것과 관련지을 수 있다

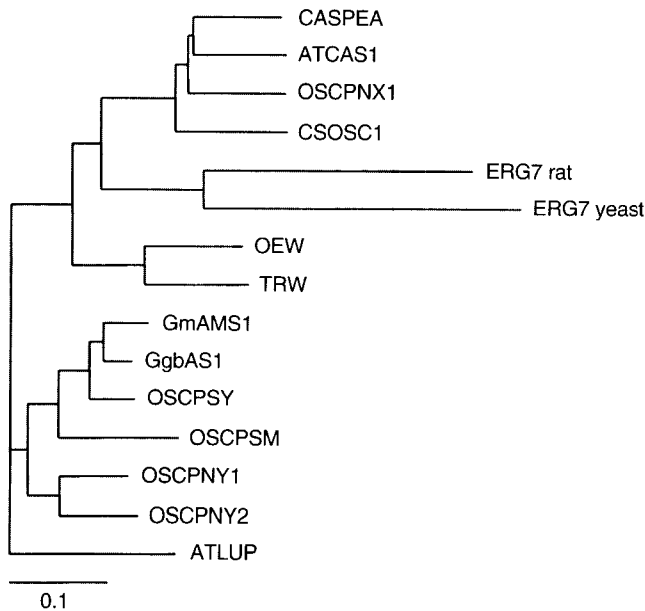


Figure 3. Phylogenetic relationship of oxidosqualene cyclases. The sequences used to build this tree are: for β -amyrin synthases, soybean GmAMS1 (Ay095999), licorice GgAS1 (AB037203), pea OSCPSY (AB034802), ginseng OSCPNY1 (AB009030), and OSCPNY2 (AB014057); for mixed amyrin synthase, pea OSCPSM (AB034803), for lupeol synthases, *A. thaliana* ATLUP (U49919), olive OEW (AB025343), and *T. officinale* TRW (AB025345); for cycloartenol synthase, *A. thaliana* ATCAS1 (P38605), pea CASPEA (D89619), ginseng OSCPNX1 (AB009029), and *C. speciosus* CSOSC1 (AB058507); for lanosterol synthase, rat ERG7 (P48450) and yeast ERG7 (P38604).

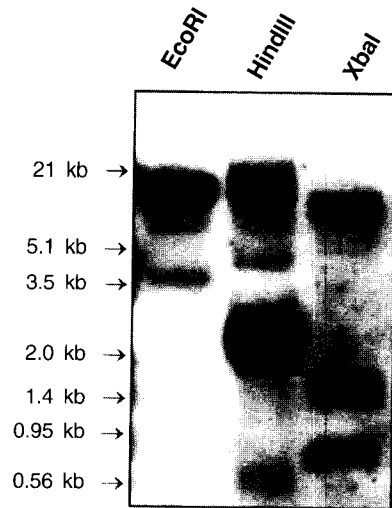


Figure 4. Genomic southern blot analysis of GmAMS1. Ten micro gram of genomic DNA was digested with *EcoRI*, *HindIII*, or *XbaI* and loaded on each lane. Size markers are indicated on the left.

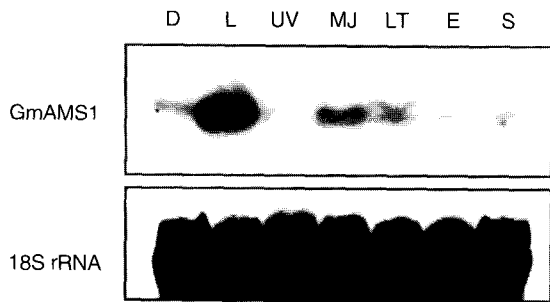


Figure 5. Expression of GmAMS1 under various stresses in dark-grown soybean seedlings. Hypocotyls of 5 day old seedlings were harvested 6 hours after treatment. Fifteen microgram of total RNA was loaded on each lane. The membrane was reprobed with 18S rDNA amplified from soybean genomic DNA. D, dark; L, light; UV, ultraviolet-B; LT, low temperature (4°C); MJ, methyl jasmonate (10 μM); E, elicitor (25 mg/ml yeast extract); S, salt (250 mM NaCl).

(Hodges et al. 1997, Pinhero et al. 1997). 활성산소는 단지 산화 스트레스에 관련된 것뿐만이 아니라, 식물체의 병원균에 대한 방어기작과 programmed cell death 등에 있어 중요한 조절요소로 작용한다 (Bestwick et al. 1998, Jabs 1999). 동물세포에서도 마찬가지로 활성산소가 다양한 세포 과정에 관여하는데, 사포닌이 가지는 다양한 생리활성은 이러한 사포닌의 활성산소 제거기능에 의한 효과로 볼 수 있다. GmAMS1 유전자와 사포닌의 생물학적 기능을 분명히 밝히기 위해서는 돌연변이체 또는 형질전환체 등을 통해 좀더 심도있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

적 요

Suppression subtractive hybridization (SSH)를 통해 상처에 의해 발현이 유도되는 cDNA들을 분리하였고, 그 중 하나인 *gmwi33*은 β-amyrin synthase 유전자들과 높은 유사성을 보였다. *gmwi33*의 전장 cDNA인 GmAMS1은 2416 bp 길이에 739 개 아미노산으로 구성된 긴 open reading frame (ORF)를 포함하고 있었다. GmAMS1 단백질은 감초의 β-amyrin synthase인 GgbAS와 89%, 완두의 OSCPSY와 86%의 유사성을 보였다. 암조건 하에 5일간 기른 콩나물에서, GmAMS1은 빛을 쬐어 주었을 때 가장 강하게 발현되었고 methyl jasmonate 처리와 저온처리 시에도 발현이 유도된 반면, UV-B나 elicitor를 처리하였을 때는 발현이 유도되지 않았다. 이러한 GmAMS1의 발현양상은 사포닌의 활성산소 제거기능과 밀접한 연관이 있을 것으로 추측된다.

사사-본 논문은 한국과학재단 특정기초연구 (2000-2-2100-001-3) 및 2001년도 농업기술개발 사업 연구개발비 20010230) 지원에 의하여 수행되었음을 감사드립니다.

인용문헌

- Abe I, Rohmer M, Prestwich GD (1993) Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem Rev* 93:2189-2206
- Abe I, Prestwich GC (1994) Active site mapping of affinity labeled rat oxidosqualene cyclase. *J Biol Chem* 269:802-804
- Abe I, Prestwich GC (1995) Molecular cloning, characterization, and functional expression of rat oxidosqualene cyclase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9274-9278
- Anderson RL, Wolf WJ (1995) Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr* 125:581-588
- Bestwick CS, Brown IR, Mansfield JW (1998) Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a non-host hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* 118:1067-1078
- Buntel CJ, Griffin JH (1992) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of the oxidosqualene cyclase from *Candida albicans*. *J Am Chem Soc* 114:9711-9713
- Corey EJ, Matsuda SPT, Bartel B (1993) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11628-11632
- Church GM, Gilbert (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1991-1995
- Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, Inoue K, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (2001) Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. *Biol Pharm Bull* 24: 912-916
- Hendrich S, Lee KW, Xu X, Wang HJ, Murphy PA (1994) Defining food components as new nutrients. *J Nutr* 124:1789-1792
- Herrera JBR, Bartel B, Wilson WK, Matsuda SPT (1998) Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry* 49:1905-1911
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI (1997) Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop science* 37:857-863
- Husselstein T, Schaller H, Benveniste P (2001) Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 45:75-92
- Jabs T (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 57:231-245
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y (1998a) β-amyrin synthase. Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of

- the most popular triterpene among higher plant. *Eur J Biochem* **256**:238-244
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y** (1998b) Molecular cloning of cDNA from *Panax ginseng*. The isogene that encodes β -amyryn synthase. In: Ageta H, Aimi N, Ebizuka Y, Fujita T, Honda G, (eds.) Towards Natural Medicine Research in the 21st Century. Excerpta Medica International Congress Series 1157. Elsevier Science, Amsterdam, pp 421-428
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S** (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer* **21**:113-31
- Morita M, Shibuya M, Kushiro T, Masuda K, Ebizuka Y** (2000) Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) new alpha-amyryn-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur J Biochem* **267**:3453-3460
- Nakashima H, Okubo K, Honda Y, Tamura T, Matsuda S, Yamamoto N** (1989) Inhibitory effect of glycosides like saponin from soybean on the infectivity of HIV *in vitro*. *AIDS* **3**:655-658
- Oh YJ, Sung MK** (2001) Soybean saponins inhibit cell proliferation by suppressing PKC activation and induce differentiation of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* **39**:132-138
- Okubo K, Yoshiki Y** (1996) Oxygen-radical-scavenging activity of DDMP-conjugated saponins and physiological role in leguminous plant. *Adv Exp Med Biol* **405**:141-54
- Okubo K, Yoshiki Y** (2000) The role of triterpenoid on reactive oxygen scavenging system: approach from the new chemiluminescence system (XYZ system). *Biofactors* **13**:219-223
- Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE** (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:12923-12928
- Pinhero RG, Rao MV, Paliyath G, Murr DP, Fletcher RA** (1997) Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol* **114**:695-704
- Poralla K, Hewelt A, Prestwich GD, Abe I, Reipen I, Sprenger G** (1994) A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends Biochem Sci* **19**:157-158
- Sambrook J, Russell DW** (2000) Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Shi Z, Buntel CJ, Griffin JH** (1994) Isolation and characterization of the gene encoding 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:7370-7374
- Shiraiwa M, Kudo S, Shimoyamada M, Harada K, Okubo K** (1991) Composition and structure of "group A saponin" in soybean [*Glycin max*] seed. *Agri Biol Chem* **55**:315-322
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N** (1983) Molecular identification and isolation of *Waxy* locus in maize. *Cell* **35**:225-233
- Van der Heijden R, Threlfall DR, Verpoorte R, Whitehead IM** (1989) Regulation and enzymology of pentacyclic triterpenoid phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry* **28**:2981-2988
- Verwoerd TC, Dekker BM, Hoekema A** (1989) A small-scale procedure for rapid isolation of plant RNAs. *Nucl Acid Res* **17**:2362

(접수일자 2002년 4월 19일)