식물생명공학회지 제32권 제1호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 32, No. 1, 63~71 (2005)

강낭콩 현탁배양세포에서 추출된 Enzyme Pool의 C_{27} Brassinosteroids 합성능력

김태욱, 주세환, 김성기*
중앙대학교 생명과학과

Ability for Biosynthesis of C_{27} Brassinosteroids by an Enzyme Pool Prepared from Cultured Cells of *Phaseolus vulgaris*

Tae-Wuk Kim, Se-Hwan Joo, Seong-Ki Kim*
Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT A cell-free enzyme solution prepared from suspension cultured cells of *Phaseolus vulgaris* successfully mediated conversions of cholesterol → cholestanol and 6-deoxo-28-norteasterone ↔ 6-deoxo-28-nor-3-dehydroteasterone ↔ 6-deoxo-28-nortyphasterol → 6-deoxo-28-norcastasterone → 28-norcastasterone. Although conversion of cholestanol to 6-deoxo-28-norteasterone intermediated by 6-deoxo-28-norcathasterone was not demonstrated, this strongly suggests that a complete set of biosynthetic enzymes catalyzing reactions from cholesterol to 28-norcastasterone via 6-deoxo-28-nor type brassinosteroids is endogenously present in the cells, which demonstrates that a C_{27} brassinosteroids biosynthetic pathway, namely the late C-6 oxidation for C_{27} brassinosteroids, is operative in the cells. Additionally, the enzyme solution mediated conversion of 28-norcastasterone to castasterone in the presence of S-adenosyl-methionine and NADPH, providing that the C_{27} brassinosteroids biosynthesis is an important route to generate castasterone in the cells. Together with our previous finding that castasterone can be biosynthesized by the same biosynthetic pathway in tomato, this study demonstrates that the C_{27} brassinosteroids biosynthesis is a common alternative process to maintain endogenous level of castasterone, an active C_{28} brassinosteroid, in plants.

Key words: Biosynthesis, C_{27} brassinosteroids, enzymatic conversion, *Phaseolus vulgaris*

서 론

Brassinosteroids (BRs)는 식물의 생장과 분화를 조절하는 steroidal 식물호르몬으로서 현재까지 약 40여종의 관련화합물이 천연으로부터 동정되었다. 천연의 BRs은 C_{27}, $_{28}$, $_{29}$ steroids로서 C24 위치에 존재하는 alkyl기의 종류에 따라 구분되며, 이중 가장 높은 생리활성을 갖는 brassinolide (BL)와 BL의 직접적인 생합성 전구체인 castasterone (CS) 등과 동일한 탄소골격을 갖는 24-methyl 형의 C_{28} BRs가 C_{27}, C_{29} BRs보다 식물계 내 훨씬 넓게 분포하고 높은 활성을 나타낸다 (Yokota 1997; Fujioka 1999; Bajguz and Tretyn 2003). 이러한 이유로 BRs의 식물체 내 생합성 과정은 C_{28} BRs를 중심으로 관련 화합물의 순차적인 feeding 실험을 통한 생화학적 연구와 BRs 생합성 효소 결핍 mutants 등을 이용한 분자유전학적 연구를 통해 지난 수년간 집중적으로 이루어졌다. 그 결과 C_{28} BRs의 생합성은 C_{28} BRs와 동일한 탄소 골격을 갖는 식물의 주요 sterol인 campesterol (CR)을 전구체로 하여 생합성 되는 것으로 알려졌는데, CR은 초기 생합성 과정을 통해 campestanol (CN)

*Corresponding author Tel 02-820-5210 Fax 02-820-5206
E-mail skkimbio@cau.ac.kr

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 CS을 합성하고, CS은 다시 BL로 전환되는 것으로 알려졌다 (Yokota et al. 1997; Sakurai 1999; Yokota 2000; Bishop and Yokota 2001).

C_{28} BRs에 대한 생합성에 관한 연구와는 달리 C_{27}, C_{29} BRs 또한 내생의 BRs로서 다수가 동정되었음에도 불구하고 식물체 내에서 생합성을 비롯한 이들의 대사과정이나 그 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다. 그러나 Yokota (1997)는 토마토에서 C_{27} BRs인 28-norCS과 이와 동일한 탄소골격을 갖는 cholesterol (CHR)을 함께 동정함으로써 내생의 28-norCS이 식물체 내에서 CHR로부터 생합성 될 가능성을 처음으로 제시하였으며 애기장대, 담배, 일일초 등에서 CHR이 cholestanol (CHN)로의 전환과정이 확인되었고 (Nakajima et al. 2002), 특히, CHR이 높은 함량의 sterol로서 존재하는 토마토에서 이미 내생의 C_{27} BRs로서 알려진 6-deoxo-28-norCS와 28-norCS 이외에 새로운 C_{27} BRs인 6-deoxo-28-nor형의 BRs로서 6-deoxo-28-norcathasterone (6-deoxo-28-norCT)와 6-deoxo-28-nortyphasterol (6-deoxo-28-norTY) 등이 존재하는 것이 보고되었다 (Yokota et al. 2001). 이들의 구조를 근간으로 6-deoxo-28-nor형의 C_{27} BRs 또한 6-deoxo형 C_{28} BRs의 생합성 과정과 동일한 반응을 통해 CHR을 전구체로부터 6-deoxo-28-nor 형의 BRs을 경유하여 28-norCS으로 생합성 될 가능성이 대두되었다. 최근 이러한 가능성은 Kim 등 (2004)에 의하여 토마토 식물체를 이용한 효소 변환 실험을 통하여 실제로 상기의 과정에 의하여 28-norCS가 생합성 됨이 확인되었다. 또한 토마토의 C_{27} BRs의 생합성 최종산물인 28-norCS는 C24 methylation에 의하여 C_{28} BR인 CS로 전환됨이 확인되어 C_{27} BRs의 생합성 과정이 활성형 C_{28} BR(s)의 생체 농도 조절을 위한 중요한 생합성 경로 중에 하나임이 증명되었다.

토마토 식물에 있어 C_{27} BRs의 생합성과정이 활성형 C_{28} BRs의 생체 함량조절에 중요한 역할을 함이 밝혀졌으나, 이러한 생합성과정이 토마토 이외의 식물에 있어서도 일어나는 반응인지에 관해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 이런 이유로 본 연구에서는 C_{27} BRs의 생합성에 의하여 C_{28} BRs의 함량조절이 다른 식물체에서도 일어나는 반응인지를 알아봄으로서 토마토 이외의 식물에서도 C_{27} BRs의 생합성 경로에 의한 활성형 C_{28} BRs의 생체 함량조절이 식물계에 있어 보편적으로 이루어지는지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 이미 중요 phytosterol로서 CHR의 동정이 이루어진 강낭콩의 현탁 배양세포로부터 효소원을 추출하여 이를 이용한 C_{27} sterol 및 C_{27} BRs의 효소변환 실험을 수행하여 상기의 가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

강낭콩 세포의 캘러스 유도 및 현탁 배양

강낭콩 (*Phaseolus vulgaris*) 종자로부터 캘러스를 유도하기 위하여 사용되는 모든 기구를 고온 가압 멸균하였고, 모든 실험을 clean bench 내에서 수행하였다. 먼저, 강낭콩 종자를 70% ethanol과 10% 표백제로 표면 소독한 후, autoclave된 증류수로 수차례 헹구고, conical tube에 넣고, 암실에서 27℃로 5일간 발아시켰다. 발아된 종자의 epicotyl 부위를 1cm 정도의 절편으로 자른 뒤, 이 절편을 고형화 되어 있는 B5 배지 (Duchefa)에 5개씩 놓은 다음 밀봉하여 암실에서 27℃의 incubator로 배양하여 캘러스를 유도하였다. 약 3주 후 완전히 유도된 캘러스를 동일한 조성의 액체 B5 배지에 현탁시켜 분당 120 rpm 속도의 shaking incubator로 27℃ 전후를 유지하며 암실에서 배양하였다. 또, 현탁 배양된 강낭콩 세포는 약 2주마다 계대배양하였다. 계대배양 2주 후, 강낭콩 현탁 배양세포를 vacuum filtration을 통해 harvest한 뒤 -80℃의 deep freezer에서 실험에 사용할 때까지 냉동 보관하였다.

효소원 조제

효소원 조제의 모든 과정은 4℃를 유지하면서 수행하였다. 효소원의 조제는 먼저 harvest 된 강낭콩 현탁 배양세포를 해사 (sea sand)와 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 3겹의 gauze를 통해 filtering한 뒤 얻어진 용액을 8,000 ×g에서 10분간 원심분리 (Hicen 21, Herolab) 하였다. 이후 상층액 만을 모아 다시 20,000 ×g에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액은 cold acetone (final concentration 40%)을 첨가하여 -25℃에서 10분간 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 대상식물의 cytosol과 microsome을 모두 포함하는 효소원 (crude enzyme solution)으로 사용하였다.

한편 microsomal 효소원을 조제하기 위해서는 상기와 동일한 방법을 통해 얻어진 20,000 ×g supernatant를 다시 190,000 ×g에서 120분간 초고속 원심분리 (Kontron Centrikon T-1180) 하였다. 침전된 pellet을 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol을 함유하는 0.1 M sodium phos-

phate buffer (pH 7.4)로 재현탁하여 microsomal 효소원으로 사용하였다.

단백질 정량

조제된 효소원내의 단백질 양은 Bovine Serum Albumin (BSA)을 standard로 사용하여 Bradford 방법으로 정량하였다 (Bradford 1976).

효소 반응

28-norCS의 C24 methylation 반응을 위한 표준 assay mixture는 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁된 5-6 mg protein의 효소원 1 mL에 10 μg의 28-norCS과 0.4 mM S-adenosyl-L-Methionine (SAM), 그리고 0.4 mM NADPH로서 구성하였다. 효소반응은 NADPH의 첨가에 의해 개시되어 37℃에서 30분간 incubation한 뒤 1.2 mL의 ethyl acetate를 넣어 반응을 종료하였으며, 반응산물의 정량을 위한 internal standard로서 [26,28-$^2H_6$]CS 50 ng을 넣어주었다. C24 methylation의 cofactor 요구성을 조사하기 위해서는 표준 assay mixture에 0.4 mM NADPH 또는 0.4 mM SAM 대신 동일 volume의 증류수 또는 0.4 mM의 NADH를 넣어주었다. 또한 기질 특이성을 확인하기 위해서는 28-norCS 대신 동량의 26-norCS을 넣어주었다.

CHR이 CHN으로의 전환을 촉매 하는 효소의 활성을 조사하기 위하여 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁된 2-3 mg protein의 효소원에 95% ethanol에 녹인 CHR 15 μg을 넣어주었고 cofactor로서 0.4 mM NADP와 0.4 mM NADPH를 함께 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 효소반응은 1.2 mL의 water-saturated ethyl acetate를 첨가하여 종료하였다.

CHN에서 6-deoxo-28-norCT를 거쳐 6-deoxo-28-norteasterone (6-deoxo-28-norTE)로 전환되는 반응은 효소의 활성이 매우 낮은 것으로 알려져 있어 microsomal 효소원을 사용하였다. 초고속 원심분리에 의해 얻어진 pellet을 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁하여 5 mg protein이 되도록 준비한 microsomal 효소원에 기질로서 CHN 또는 6-deoxo-28-norCT를 20 μg을 넣어주고 cofactor로서 0.8 mM NADPH를 첨가한 뒤 37℃에서 30분간 반응하였다. 30분 뒤 1.2 mL의 water-saturated ethyl acetate를 첨가하여 효소반응을 종료하였다.

C_{27} BRs의 C3 epimerization을 조사하기 위한 효소의 assay mixture는 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁 된 5-6 mg protein의 효소원에 95% ethanol에 녹인 substrate로 6-deoxo-28-norTE, 6-deoxo-28-nor-3-dehydroteasterone (6-deoxo-28-nor-3-DHT)와 6-deoxo-28-norTY를 각각 5 μg씩을 넣어주었고 2α-hydroxylation을 위한 assay에서는 기질인 6-deoxo-28-norTY와 H_2O에 녹인 0.8 mM NADPH를 함께 넣어 total 1.2mL volume으로 구성하였다. 모든 assay는 duplicate 또는 triplicate로 수행하였고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 30분 후 1.2 mL의 water- saturated ethyl acetate를 첨가하여 반응을 종료하였다.

28-norCS의 직접적인 생합성 전구체를 조사하기 위하여 예상되는 기질인 6-deoxo-28-norCS을 이용한 assay를 수행하였다. 1.5 mM 2-mercaptoethanol과 30% glycerol이 함유되어있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 현탁된 5-6 mg protein의 효소원 1 mL에 10 μg의 6-deoxo-28-norCS을 기질로 넣어준 뒤 37℃에 30분간 incubation하고 ethyl acetate 첨가에 의해 효소반응을 종료하였다. Internal standard로서는 [26,28-$^2H_6$]6-deoxoCS 100 ng을 넣어 주었다.

효소 반응 산물의 정제

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 acetate층을 모아 speed vacuum으로 농축 건조하였다. Speed vacuum으로 농축 건조된 ethyl acetate 분획을 50% MeOH에 녹여 Sep-Pak C18 cartridge (Waters) column에 loading 하였다. 이 때, Sep-Pak C18 cartridge는 H_2O와 MeOH로 수 회 번갈아가며 conditioning 하였으며, 최종적으로 50% MeOH로 equilibrium시켰다. 반응 산물의 elution은 50% MeOH 5 mL, 100% MeOH 5mL씩 차례로 흘려주었으며, 이 때의 100% MeOH 분획만을 수집하여 농축 · 건조하였다.

Sep-Pak C18 cartridge column을 통하여 얻어진 농축분을 reversed phase HPLC (Gilson 305 pump/805 manometric module/811C mixer)을 이용해 정제하였다. 이때 사용한 HPLC의 조건은 다음과 같다: Pegasil ODS column (10 X 150 ㎜), flow rate 2.5 mL/min, mobile phase; 0 - 20 min: 45% acetonitrile, 20 - 40 min: gradient to 100% acetonitrile. 각 분획들은 1분마다 수집하였으며, 파장 205 ㎚에서의 흡수 곡선으로 monitoring 하였다. 얻어진 분획들 중 동일조건 하에서 authentic BRs Rt에 해당하는 분획들만을 모아 농축 · 건조하여 GC-MS/SIM 분석을 행하였다.

효소반응 산물의 확인

HPLC 후 얻어진 분획을 GC-MS/SIM로 분석하기 위해서는 BRs의 hydroxyl기를 non-polar하게 masking해야 GC

에서의 기화가 잘 일어나 peak의 tailing을 막을 수 있다. 이에 분석하고자 하는 BRs의 구조적 특징에 따라 HPLC 분획에 대해 GC 분석 전 vicinal hydroxyl기는 methaneboronation (MB)체화 하고 단일 hydroxyl기는 trimethylsilyl (TMSi)체화 하였다. MB체의 합성은 20 μg methaneboronic acid / 10 μL pyridine을 시료에 25 μL 첨가한 뒤, 70℃에서 30분간 반응시켰다. 또한 MB-TMSi체는 MB 반응을 먼저 한 후 10 μL의 MSTFA (N-methyl-N-TMS-trifluoroacetamide) 를 첨가하여 70℃에서 30분간 반응시켰다.

반응 산물의 분석을 위해 GC (HP 6890)-MS (HP 5973 : ionization voltage 70eV)를 사용하였다. GC column으로는 0.25 ㎜ × 30 m, 0.25 ㎛ 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℃, oven temperature는 175℃에서 2분간 유지된 후, 280℃까지 매 분 40℃씩 상승시켜 280℃로 유지시켰다.

결 과

C24 methylation을 통한 28-norCS의 CS으로의 전환

28-norCS의 CS으로의 변환은 28-norCS의 C24에 methyl기가 첨가되는 C24 methylation 반응을 통해 촉매 될 것으로 생각되었다. C24 methylation을 통한 28-norCS의 CS으로의 전환과정이 강낭콩 배양세포내 존재하는지 확인하고자 강낭콩 현탁 배양세포로부터 얻어진 효소원을 이용하여 효소 변환연구를 수행하였다. 일반적인 sterol의 side chain methylation 과정은 side chain에 이중결합의 형성, methyltransferation, reduction 등의 일련의 반응을 통해서 일어나는 것으로 생각된다. 특히, 이중결합의 형성은 yeast 등에서 Cyt P450에 의해 촉매 되고 (Kelly et al. 1995) methyltransferation은 SAM-dependent sterol methyltransferase (SMT)에 의해 촉매 되며 (Shi et al. 1996; Diener et al. 2000) reduction 반응을 위해서는 일반적으로 electron donor가 필요한 점을 감안하여 본 연구에서의 C24 methylation 반응을 위한 표준 assay mixture를 강낭콩 효소원 1 mL에 5 μg의 28-norCS과 0.4 mM SAM, 그리고 0.4 mM NADPH로서 구성하였다.

Reversed phase HPLC를 통해 얻어진 분획 중 authentic CS의 Rt와 일치하는 분획을 수집하여 bismethaneboronate (BMB)체화한 뒤 GC-MS로 분석한 결과, CS BMB체의 분자량 ion peak인 *m/z* 512와 base peak로서 C20-C22 분열에 기인하는 *m/z* 155, C23-C24 분열에 의한 *m/z* 441 그리고 6-ketone기를 가진 BRs에서 나타나는 *m/z* 358과 *m/z* 287의 peak를 포함하는 mass spectrum이 authentic CS BMB체의 GC Rt과 동일한 Rt인 26.80'에서 얻어져 본 반응 산물은 강낭콩 배양세포에서 조제한 효소원에 의해 28-norCS에서 전환된 CS이라고 사료되었으며 internal standard로 넣어준 [26,28-$^2H_6$]CS의 peak인 *m/z* 518을 이용해 계산한 효소활성은 10.10 ng/mg protein으로 나타났다 (Figure 1).

상기의 C_{27} BRs methylation이 28-norCS에 대해 특이적 반응인지를 확인하고자 26-norCS이 C25 methylation을 통해 CS으로 전환될 수 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 효소반응은 상기의 표준 assay mixture에서 기질로서 28-norCS 대신 26-norCS을 넣어 수행하였다. 37℃에서 30분간 incubation한 뒤 ethyl acetate를 넣어 반응 종료하였으며, 반응산물의 정량을 위한 internal standard로서 [26,28-^{2}

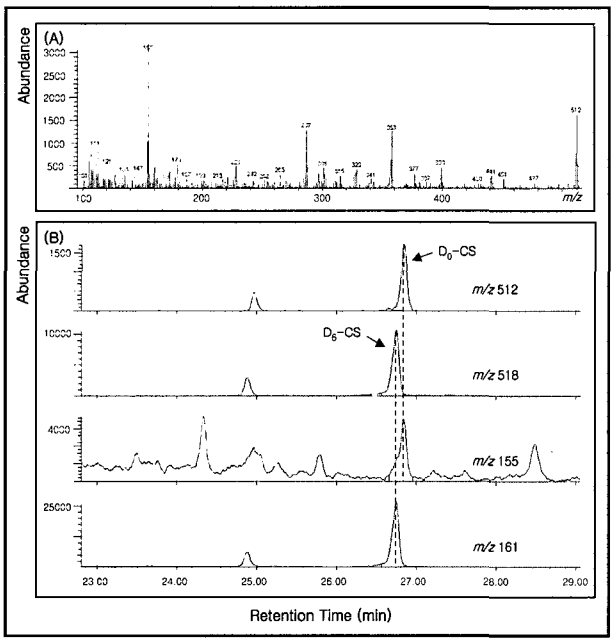

Figure 1. Identification of CS as the enzyme product of 28-norCS in cultured cells of *Phaseolus vulgaris*. (A) Mass Spectrum, (B) Extracted ion chromatogram for quantitative analysis.

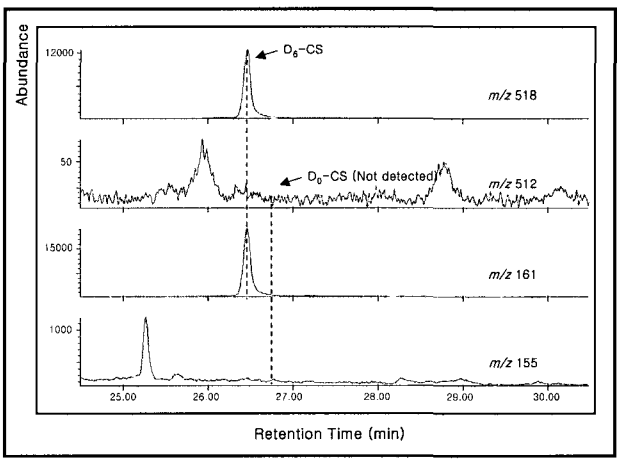

Figure 2. GC-SIM analysis of methylation of 26-norCS in cultured cells of *Phaseolus vulgaris*.

H_6]CS 50 ng을 넣어주고 ethyl acetate로 추출한 반응산물을 Sep-Pak C18과 reversed phase HPLC를 통하여 정제하여 GC-SIM으로 최종분석 하였다. Reversed phase HPLC를 통해 얻어진 분획 중 authentic CS의 Rt와 일치하는 분획을 수집하여 BMB체화 한 뒤 GC-MS로 분석한 결과, Figure 2에 나타낸 것과 같이 internal standard로 넣어준 [26,28-$^2H_6$]CS BMB체의 주요 ion인 *m/z* 518, 358, 287, 161 등의 peak만이 확인될 뿐 CS BMB체의 주요 ion인 *m/z* 512, 155 등의 peak가 검출되지 않아 26-norCS은 methylation을 통해 CS으로 전환되지 않음을 확인하여 C_{27} BRs의 methylation은 C24에 특이적으로 일어나는 반응임을 알 수 있었다.

CHR에서 CHN로의 전환

CHR에서 CHN의 전환은 CR의 CN으로의 전환과 동일한 isomerization/dehydrogenation, reduction 등의 반응을 거치는데 이에 효소반응을 위해서 효소원에 CHR을 기질로서 넣어주고 cofactor로서 0.4 mM의 NADP와 NADPH를 함께 첨가하여 37℃에서 30분간 incubation하였다. ethyl acetate로 추출한 반응산물은 Sep-Pak SiO_2와 C18, 그리고 reversed phase HPLC 등을 통한 일련의 정제 과정을 거친 후 GC-MS로 반응산물을 최종 분석하였다. Figure 3에 나타낸 것과 같이 대사산물의 HPLC 분획 중 authentic CHN의 Rt에 해당하는 분획을 TMSi체화 하여 GC-MS를 통해 분석결과 Rt 12.39'에서 분자량 ion인 *m/z* 460과 base peak ion인 *m/z* 215를 비롯하여 *m/z* 445, 403, 370, 355, 306 등이 주요 ion으로 나타나는 spectrum을 얻을 수 있었다. 이를 authentic CHN TMSi체와 비교한 결과 spectrum과 Rt이 정확하게 일치하여 본 대사산물을 CHN로서 구조결정 하였다. 이로서 강낭콩 세포에서는 CHR부터 CHN으로 전환되는 C_{27} BRs의 초기 생합성 과정 또한 존재함을 확인할 수 있었다.

CHN에서 6-deoxo-28-norTE로의 전환

CHN에서 6-deoxo-28-norTE로의 전환은 6-deoxo-28-norCT를 경유해서 일어나는 22- 및 23-hydroxylation 반응으로 cytochrome P450 단백질에 의하여 촉매 되어 질 것으로 사료되었다. 이에 준비된 효소원에 cofactor로서 NADPH을 첨가하고 기질로 CHN과 6-deoxo-28-norCT을 사용하여 효소변환을 조사하였다. 그러나 낮은 효소 활성으로 기인하여 효소반응의 product를 확인 할 수 없었다. 이에 효소원을 다시 초고속 원심분리로 microsomal 효소원을 조제하여 상기의 효소 반응을 재시도 하였으나 불행히도 역시 기대되는 효소 반응물인 6-deoxo-28-norCT와 6-deoxo-28-norTE의 검출은 이루어지지 않았다 (data not shown).

6-Deoxo-28-norTE에서 6-deoxo-28-norTY으로의 전환

BRs의 생합성 과정 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 C3 epimerization 반응을 6-deoxo-28-norTE와 6-deoxo-28-nor-3-DHT 및 6-deoxo-28norTY을 기질로 사용하여 조사하였다. 우선 강낭콩 현탁 배양세포로부터 조제한 효소원에 6-deoxo-28-norTE을 기질로 넣어주고 37℃에서 30분간 incubation 한 뒤 ethyl acetate로 반응산물을 추출하였다. 추출물을 Sep-Pak C18과 reversed phase HPLC를 통해 효소 반응산물을 정제한 후 GC-MS로 최종분석을 시도하였다. HPLC로 분리한 분획들 중 효소반응산물로 예상되는 6-deoxo-28-nor-3-DHT의 HPLC Rt에 해당하는 분획을 BMB체화하여 GC-MS로 분석한 결과 Figure 4A에 나타낸 것과 같이 Rt와 동일한 16.48'에서 authentic 6-deoxo-28-nor-3-DHT MB체와 동일한 spectrum을 얻을 수 있었다. 이에 강낭콩 세포의 효소원내에 존재하는 6-deoxo-28-norTE dehydrogenase에 의해 6-deoxo-28-norTE가 6-deoxo-28-nor-3-DHT로 전환되었음을 확인할 수 있었다. 또한 HPLC 분획들 중 authentic 6-deoxo-28-norTY의 Rt에 해당하는 분획을 MB-TMSi체화하여 GC-MS로 분석하였다. 그 결과 Figure 4B에 나타낸 것과 같은 spectrum이 얻어졌는데 이를 authentic 6-deoxo-28-norTY의 MB-TMSi체와 비교해본

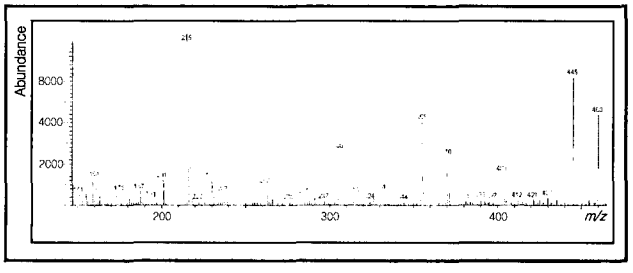

Figure 3. Identification of CHN as the product of CHR in cultured cells of *Phaseolus vulgaris*.

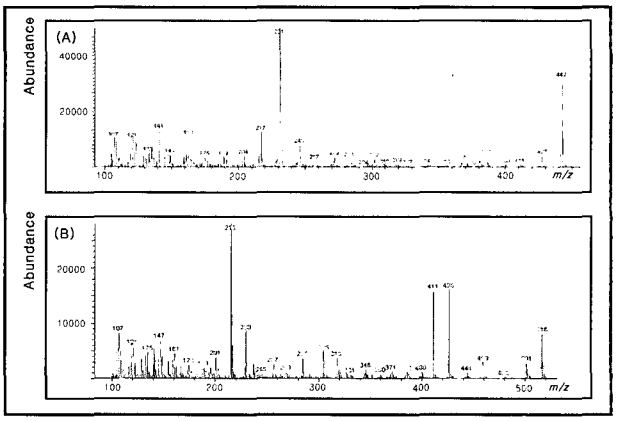

Figure 4. Identification of 6-deoxo-28-nor-3-DHT (A) and 6-deoxo-28-norTY (B) as enzyme products of 6-deoxo-28-norTE in cultured cells of *Phaseolus vulgaris*.

결과 spectrum의 Rt이 정확하게 일치하여 본 대사산물을 6-deoxo-28-norTY로 구조결정 하였다. 이에 강낭콩 세포로부터 조제한 효소원을 통하여 기질로 넣어준 6-deoxo-28-norTE이 6-deoxo-28-nor-3-DHT를 거쳐 6-deoxo-28-norTY까지 전환된 것으로 확인되었다.

다음으로, 강낭콩 배양세포에서도 6-deoxo-28-nor-3-DHT의 6-deoxo-28-norTY로의 전환과 6-deoxo-28-norTE로의 역반응이 존재하는지 조사하였다. 6-deoxo-28-nor-3-DHT를 기질로 사용한 효소반응 후 얻어진 반응산물을 reversed phase HPLC로 분리한 분획 중 authentic 6-deoxo-28-norTE와 6-deoxo-28-norTY의 Rt에 해당하는 분획을 각각 MB- TMSi 체화하여 GC-MS로 분석하였다. Figure 5에 나타낸 것처럼 authentic 6-deoxo-28-norTE와 6-deoxo-28-norTY의 MB-TMSi체의 동일한 Rt에 동일한 MS spectrum이 얻어져 강낭콩 세포의 효소원에 의해 6-deoxo-28-nor-3-DHT이 6- deoxo-28-norTY로 전환되었고 (Figure 5A) 또한 역반응을 통해 6-deoxo-28-nor-3-TE로도 전환되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 5B).

마지막으로 상기의 결과를 바탕으로 강낭콩 세포 내에서 6-deoxo-28-norTY이 역반응을 통해 6-deoxo-28-norTE로 전환되는지 조사하고자 하였다. 이에 6-deoxo-28-norTY를 기질로 넣어준 효소변환연구를 수행하여 reversed phase HPLC로 최종 정제한 분획 중 authentic 6-deoxo-28-nor-3-DHT와 6-deoxo-28-norTE의 Rt에 해당하는 분획을 각각 MB체 또는 MB-TMSi체화하여 GC-MS로 분석하였다. 그 결과 동일조건에서 authentic 6-deoxo-28-nor-3-DHT의 HPLC Rt에 해당하는 분획에 대한 MS spectrum을 authentic 6-deoxo-28-nor-3-DHT MB체와 비교해본 결과 spectrum과 Rt이 정확하게 일치하여 본 반응산물은 6-deoxo-28-nor-3-DHT로 구조결정 하였다 (Figure 6A). 또한 동일조건에서의 authentic 6-deoxo-28-norTE의 HPLC Rt에 해당하는 분획에 대한 GC-MS 분석 결과 authentic 6-deoxo-28-norTE MB-TMSi체와 spectrum과 Rt이 일치하여 본 대사산물은 6-deoxo-28-norTE로 확인되었다 (Figure 6B). 이에 강낭콩 배양세포 내에서 6-deoxo-28-norTY이 역반응을 통해 6-deoxo-28-norTE로도 전환되는 과정이 존재함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로서 본 연구에서는 강낭콩 현탁 배양세포에서도 6-deoxo-28-norTE의 6-deoxo-28-norTY로의 C3 epimerization이 존재하며 또한 이 반응은 가역반응임을 확인하였다.

6-Deoxo-28-norTY에서 6-deoxo-28-norCS으로의 전환

강낭콩 세포로부터 조제한 효소원 내 6-deoxo-28-norTY 2α-hydroxylase의 활성을 확인하기 위해 효소원에 6-deoxo-28-norTY와 NADPH를 함께 넣어준 후 효소반응 시켰다. 반응산물 분석을 위해 reversed phase HPLC를 통해 정제한 분획들 중 authentic 6-deoxo-28-norCS의 HPLC Rt에 해당하는 분획을 GC-SIM으로 분석하였다. 반응산물을 BMB 체화하여 GC-SIM으로 분석한 결과 Figure 7에서처럼 분자량 peak인 *m/z* 484와 base peak인 *m/z* 273 그리고 *m/z* 469, 288, 141 등의 peak가 Rt 16.60'에 동시에 나타났는데 이를 authentic 6-deoxo-28-norCS의 BMB체와 비교한 결과 fragmentation pattern과 Rt이 정확하게 일치하여 본 대사산물은 6-deoxo-28-norCS으로 구조결정 하였다. 이로서 강낭콩 세포의 효소원 내 6-deoxo-28-norTY 2α-hydroxylase 의해 6-deoxo-28-norTY이 6-deoxo-28-norCS으로 전환되었음을 확인할 수 있었다.

6-Deoxo-28-norCS에서 28-norCS으로의 전환

28-norCS의 생합성 전구체로 예상되는 6-deoxo-28-norCS

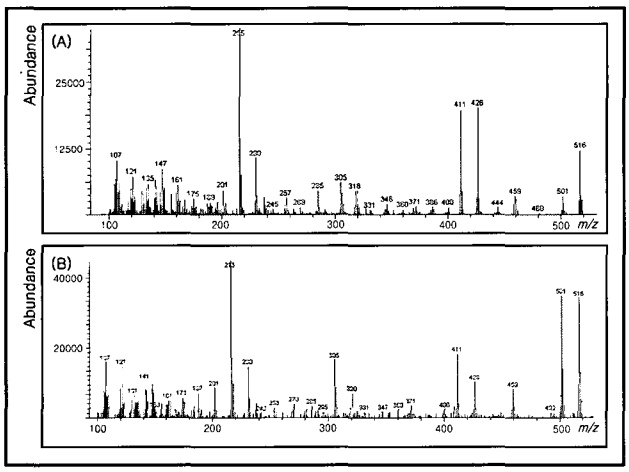

Figure 5. Identification of 6-deoxo-28-norTE (A) and 6-deoxo-28-norTY (B) as enzyme products of 6-deoxo-28-nor-3-DHT in cultured cells of *Phaseolus vulgaris*.

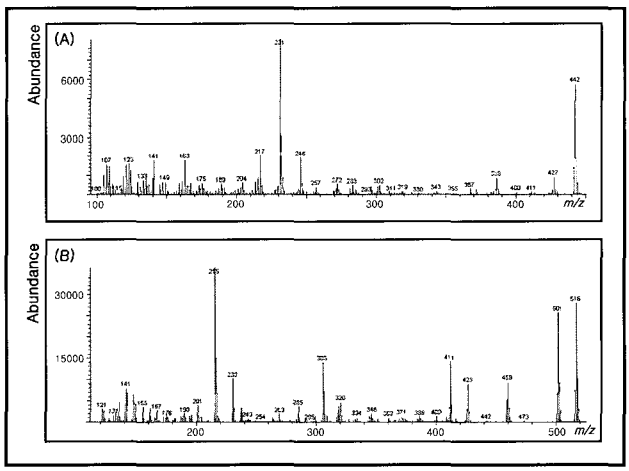

Figure 6. Identification of 6-deoxo-28-nor-3-DHT (A) and 6-deoxo-28-norTE (B) as enzyme products of 6-deoxo-28-norTY in cultured cells of *Phaseolus vulgaris*.

이 강낭콩 세포내 28-norCS으로 전환되는 과정이 존재하는지 확인하고자 조제한 효소원을 이용하여 6-deoxo-28-norCS의 *in vitro* 효소변환을 조사하고자 하였다. 효소원 1 mL에 6-deoxo-28-norCS을 기질로 넣어준 뒤 NADPH를 첨가하여 37℃에 30분간 incubation하고 ethyl acetate 첨가에 의해 효소반응을 종료하였다. Internal standard로서는 [26,28-$^2H_6$]6-deoxoCS 100 ng을 넣어 주었고 ethyl acetate로 추출한 반응산물은 Sep-Pak C18과 HPLC를 통해 정제하였다. Reversed phase HPLC로 나누어진 분획 중 6-deoxo-28-norCS의 대사산물로 예상되는 6-deoxoCS의 Rt에 해당하는 분획만을 모아 BMB체화 하여 GC-SIM으로 최종 분석을 시도하였다. HPLC로 정제한 분획 중 28-norCS의 Rt에 해당하는 분획을 GC-SIM으로 분석한 결과 28-norCS BMB체의 특징적인 peak로서 분자량 ion인 *m/z* 498을 비롯한 *m/z* 483, 358, 287, 141의 peak가 authentic 28-norCS BMB체와 동일한 GC Rt (23.22')에 나타나 본 반응산물을 28-norCS으로 구조결정 하였다 (Fig. 8).

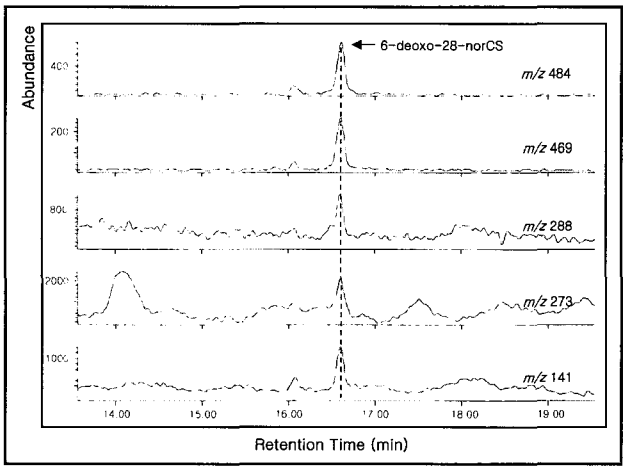

Figure 7. Identification of 6-deoxo-28-norCS as the enzyme product of 6-deoxo-28-norTY in cultured cells of *Phaseolus vulgaris* by GC-SIM analysis.

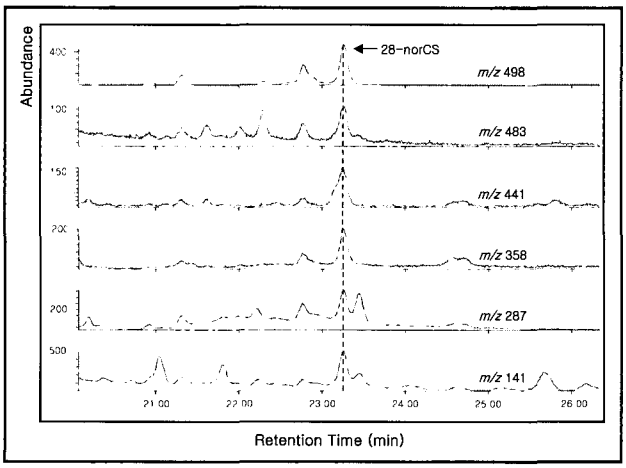

Figure 8. Identification of 28-norCS as the enzyme product of 6-deoxo-28-norCS in cultured cells of *Phaseolus vulgaris* by GC-SIM analysis.

고 찰

이상의 효소 변환 실험 결과를 통해 강낭콩 배양세포에서 CHR → CHN 및 6-deoxo-28-norTE ↔ 6-deoxo-28-nor-3-DHT ↔ 6-deoxo-28-norTY → 6-deoxo-28-norCS → 28-norCS의 생합성 경로가 확인되어, 강낭콩 세포내에는 위의 생합성 과정을 촉매 하는 효소들이 포함되어 있음이 밝혀졌다. 이는 비록 강낭콩 세포에서 CHN에서 6-deoxo-28-norCT를 경유한 6-deoxo-28-norTE로의 전환을 촉매 하는 효소의 존재는 본 실험을 통하여 확인되지 못했지만, 일반적으로 C_{28} BRs의 생합성의 경우에 있어서도 CN에서 6-deoxoCT를 거쳐 6-deoxoTE로의 전환인 22- 및 23-hydroxylation 반응이 극히 낮은 활성을 나타낸다. 또한, 이미 C_{27} BRs 생합성과정이 확인된 토마토에 있어서도 상기의 CHN → 6-deoxo-28-norCT → 6-deoxo-28-norTE의 효소 변환이 확인되지 않았지만 6-deoxo-28-norCT와 6-deoxo-28-norTE가 내생 C_{27} BRs로서 동정됨을 감안 할 때, 강낭콩 배양세포내에도 상기의 22- 및 23-hydroxylation을 촉매하는 효소가 포함되어 있지만 극히 낮은 효소 활성 때문에 그 효소 반응 산물이 검출되지 않은 것으로 생각되어 진다. 즉, 강낭콩 세포내에는 CHR에서부터 6-deoxo-28-nor type의 C_{27}

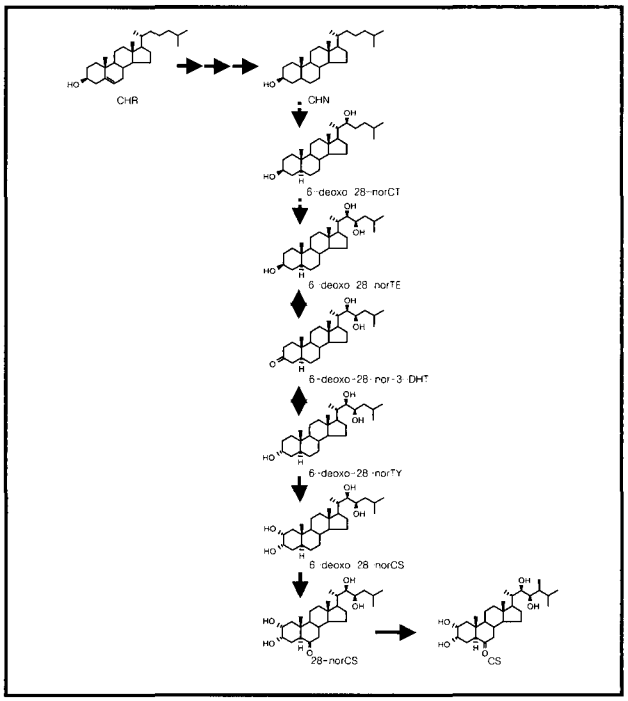

Figure 9. A biosynthetic pathway to generate CS from CHR in *Phaseolus vulgaris* cells. Solid arrows indicate the verified biosynthetic steps. Broken arrows indicate the non-verified biosynthetic steps in this study.

BRs를 경유하여 28-norCS를 생합성하는 모든 생합성효소가 포함되어 있음이 확인되어 이미 토마토 식물에서 그 존재가 확인된 C_{27} BRs의 'The late C-6 oxidation pathway'가 강낭콩 세포내에서도 존재함을 확인하였다. 결론적으로 C_{27} BRs의 생합성과정은 토마토 이외의 강낭콩에서도 그 존재가 확인되어 식물들에 있어 보편적으로 존재하는 생합성 과정임을 알 수 있었다 (Figure 9).

토마토의 경우와 마찬가지로 강낭콩 세포내에서도 CHR로부터 생합성 된 C_{27} BRs 생합성과정의 최종 산물인 28-norCS가 활성형 C_{28} BR인 CS로 전환됨을 본 실험을 통하여 확인 할 수 있었다. 이는 토마토의 경우와 같이 강낭콩 세포에 있어서도 C_{27} BRs의 생합성이 활성형 C_{28} BR(s)의 함량조절에 중요한 역할을 하고 있음을 밝힌 것으로서 이 결과를 기초로 C_{27} BRs 생합성에 의한 C_{28} BR(s)의 함량조절이 식물계에 있어 일반적으로 일어나는 과정임을 알 수 있었다.

28-norCS의 C24 methylation은 일반적으로 알려진 SMT에 의해 촉매 되는 반응과 유사한 반응기작을 나타내었는데 이는 SMT와 같은 종류의 효소에 의해서 BRs의 C24 methylation 또한 촉매 될 가능성이 존재함을 시사 하는 것으로 사료된다. 특히 현재까지 알려진 애기장대에서의 3가지 SMT (SMT1, 2, 3)중 SMT1이 C_{27} BRs의 C24 methylation 중간과정과 동일한 반응을 촉매하기 때문에 SMT1이 이러한 반응에 관여할 가능성이 높을 뿐만 아니라 SMT1의 활성은 식물체 내 C_{27} BRs의 전구체인 CHR의 level을 변화시키는 것으로 알려져 있어 (Diener et al. 2000; Clouse 2002) *smt1* mutant를 이용한 효소변환 연구나 heterologous expression 등을 통해서 SMT1과 관계된 C_{27} BRs의 생합성에 관한 연구가 진행되어야할 것으로 사료된다. 이러한 C_{27} BRs의 C24 methylation을 촉매 하는 효소의 규명은 내생 BRs의 함량조절에 있어 C_{27} BRs을 통한 생합성의 중요성을 좀더 깊게 이해할 수 있게 될 것으로 생각된다.

적 요

강낭콩 현탁 배양세포로부터 얻어진 효소원을 이용한 효소 변환 실험을 통하여 동 세포내에 cholesterol → cholestanol과 6-deoxo-28-norteasterone ↔ 6-deoxo-28-nor-3-dehydroteasterone ↔ 6-deoxo-28-nortyphasterol → 6-deoxo-28-norcastasterone → 28-norcastasterone의 생합성과정이 존재함을 확인하였다. 이 결과는 비록 cholestanol에서 6-deoxo-28-norcathasterone을 경유하여 6-deoxo-28-norteasterone로의 변환은 확인하지 못하였지만 동 세포에는 cholesterol에서부터 6-deoxo-28-nor형 brassinosteroids를 경유하여 28-norcastasterone을 생합성하는 모든 효소들이 포함되어 있음을 시사하는 것으로서, 동 세포에는 상기의 생합성과정, 즉 C_{27} brassinosteroids의 the late C-6 oxidation 과정이 작용하고 있음을 나타내는 결과라 하겠다. 또한 얻어진 효소원은 S-adenosyl-methionine과 NADPH의 존재 하에 28-norcastasterone을 castasterone으로 변환시켜, 강낭콩 세포내의 C_{28} 활성형 brassinosteroid인 castasterone의 생합성에 C_{27} brassinosteroids 생합성과정이 중요한 경로중 하나임을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 이미 본 연구실에서 밝힌 토마토에 있어 C_{27} brassinosteroids 생합성과정이 토마토의 활성형 brassinosteroid인 castasterone의 함량조절에 관여한다는 결과와 함께 토마토 이외의 식물들에 있어서도 C_{27} brassinosteroids 생합성에 의한 활성형 C_{28} brassinosteroid(s)의 함량조절에 일어나고 있음을 처음으로 밝힌 중요한 결과라 하겠다.

사 사

이 논문은 2004년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

인용문헌

Bajguz A, Tretyn A (2003) The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. Phytochem 62: 1027-1046

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. Analytical Biochem 72: 248-254

Clouse SD (2002) Brassinosteroids. In: Somerville C and Meyerowitz E, (eds), The Arabidopsis book (online version 1.0). American Society of Plant Biologists, pp 1-25

Diener AC, Li H, Zhou WX, Whoriskey WJ, Nes WD, Fink GR (2000) Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. Plant Cell 12: 853-870

Fujioka S (1999) Natural Occurrence of Brassinosteroids in the Plant Kingdom. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, (eds), Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. Springer-Verlag, Tokyo, pp 21-45

Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Parks LW, Kelly DE (1995) Purification and reconstitution of activity of *Saccharomyces cerevisiae* P450 61, a sterol Δ^{22}-desaturase. FEBS Lett 377: 217-220

Kim TW, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Yokota T, Kim SK (2004) Novel biosynthetic pathway of castasterone from cholesterol in tomato. Plant Physiol. 135: 1231-42

Nakajima N, Fujioka S, Tanaka T, Takatsuto S, Yoshida S (2002) Biosynthesis of cholestanol in higher plants.

Phytochem 60: 275-279

Sakurai A (1999) Physiological Actions of Brassinosteroids. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, (eds), Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. Springer-Verlag, Tokyo, pp 137-161

Shi J, Gonzales RA, Bhattacharyya MK (1996) Identification and characterization of an S-adenosyl-L-methionine: Δ^{24} -sterol-C-methyltransferase cDNA from soybean. J Biol Chem 271: 9384-9389

Yokota T (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. Trends Plant Sci 2: 137-143

Yokota T (2000) Brassinosteroids. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, (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 campestrol 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-norcathasterone, 6-deoxo-28-norty-phasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone. Phytochem 58: 233-238

(접수일자 2005년 2월 14일, 수리일자 2005년 3월 10일)