한국농화학회지 Vol. 24, No. 4 Dec. 1981
J. Korean Agricultural Chemical Society

Phytochrome의 분자구조와 모델 수용체와의 상호작용

송 필 순·한 태 룡

美國, 텍사스 공과대학 化學科

(1981년 11월 20일 수리)

Molecular Structure of Phytochrome and its Relation to the Hydrophobic Site Model

Pill-Soon Song, Tae-Young Han

Department of Chemistry, Texas Technological University, Lubbock, Texas 79409, USA

緖 言

식물체에 존재하는 청색 색소단백질인 phytochrome은 적색광 광수용체로서 식물의 개화, 발아, 줄기신장 및 잎의 분화, 엽록체, 엽록소, carotenoids 및 anthocyanin의 합성등 식물의 형태적, 발생적 반응에 항수적으로 작용한다.

고등식물은 적색광선에 대하여 극도로 민감한 반응을 보인다. [대부분 식물은 3×10^4 광자 /cm^2 /초(적색광선조사)에 반응한다] 이러한 높은 감도는 생리적으로 불활성한 Pr 형의 phytochrome이 적색광선(660nm)을 흡수함으로서 이루어지며, 광을 흡수한 Pr 형의 phytochrome은 생리적으로 활성인 Pfr 형의 phytochrome으로 변환(transform)되는 것이다. 이 작용기작은 그림 1에 도시하였다. Pfr 형은 장파장의 적색광선(far red light: 730nm)에 의해 Pr 형으로 변환되는데, 광선이 없는 어두운 곳에서도 천천히 Pr로 변환될 수 있다. 이것은 Pfr 형이 Pr 보다 열역학적으로 불안정하기 때문이며, 따라서 밤의 장단에 따라 각각 다른 Pfr의 변환율이 결과적으로는 식물의 계절성 및 시간감각(circadian rhythm or biological clock)을 유도하게 되는 것이다.

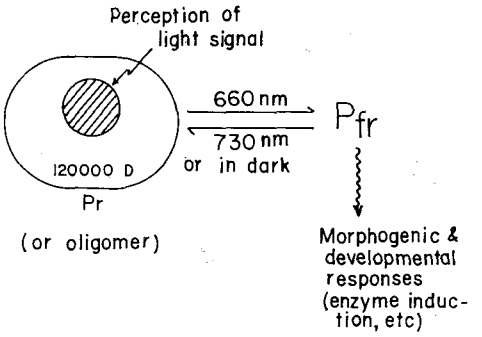

Figure. 1. The scheme for the red light-mediated plant morphogenesis and developmental responses. The shaded circle represents the covalently linked tetrapyrrole chromophore, which absorbs red light and undergoes transformation to the physiologically active form, Pfr. The molecular weight of the monomeric protein is 120,000 daltons.

다른 광수용체(예를들면 시각의 rhodopsin)의 작용과는 달리 phytochrome에 의한 식물의 형태적 및 발생적 반응은 느린 편이다(흔히 수분에서 수일간의 반응 시간을 갖는다). 이것은 적색광이 세포내의 휴면 유전인자(dormant gene)의 복사

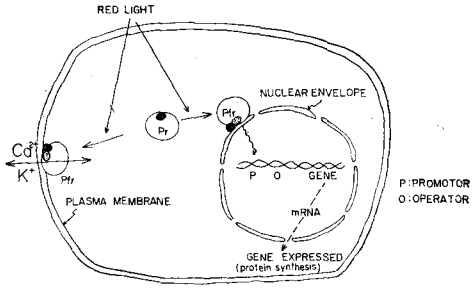

Figure. 2. The hypothetical scheme for the mode of action of phytochrome. For slow responses of plants involving gene activation, the Pfr interacts with the nuclear envelope receptor. For fast responses, the Pfr form interacts with the plasma membrane affecting its K^+ and/or Ca^{2+} ion fluxes.

(transcription)를 활성화시켜 식물의 생장 및 분화에 필요한 효소 생산을 촉진함을 의미한다(그림 2). 그러나 적색광선을 흡수한 phytochrome이 과연 어떻게 핵내의 유전인자 혹은 mitochondria 및 엽록소내의 DNA와 작용하는지는 의문으로 남아 있다.

이러한 세포내의 정보교환(intracellular communication)을 달성할 수 있는 가능한 모델을 보면 다음과 같다(그림 2 참조).

첫째, Pfr이 핵 세포막을 통하여 chromatin과 직접 반응함으로서 유전인자를 활성화시키는 방법이 있다. 그러나 이 모델이 운용되기 위해서는 Pr에서 Pfr로의 광변환(phototransformation)에 따라 단백질의 특이한 형태로의 구조변화(specific conformational change)가 필수적이다. 즉 Pfr 단백질 모양이 길죽한 장방형으로 됨으로서 Pfr이 핵막을 통과할 수 있도록 되어야 한다. 왜냐하면 120,000 dalton의 분자량을 가진 phytochrome이 핵막의 pore를 통과하기에는 너무 크기 때문이다.

둘째, Pfr이 핵막과 작용함으로서 핵막효소(예를들면 adenyl cyclase)를 활성화시키고 활성화된 효소는 휴면 유전자의 조정부위(promotor 혹은 operation site)에 결합하여 이를 활성화하는 신호전달물질(signal-carrying chemicals: 예를들면 cyclic AMP)을 생성하는 방법.

셋째, Pfr 분자가 핵막속으로 fusion을 통해 들어가는 방법.

넷째, Pfr이 원형질에서 그 수용체와 반응하여

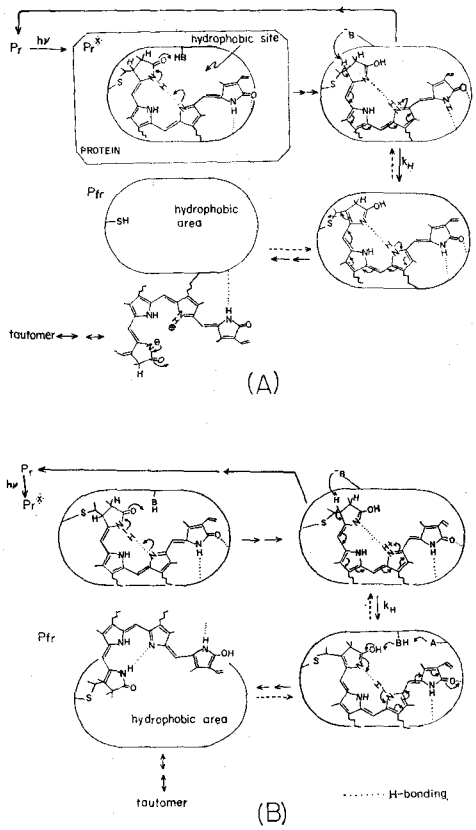

Figure. 3. The proposed chemical mechanism of the Pr ⟶ Pfr phototransformation (modified from Song *et al.*, 1979; Sarkar & Song, 1981e; Song, 1980a). Mechanism (A) assumes that the *thioether linkage* is *not released* in the phototransformation, while Mechanism (B) is based on the release of the sulfhydryl group from the thioether linkage and the propionic side chain at ring C is retained. The main features of the phototransformation are; a) *tautomeric shifts of protons*(Song *et al.*, 1979; Song & Chae, 1979; Sarkar & Song, 1981e), b) C-H bond breaking assisted by a basic group (Sarkar & Song, 1981e) and c) exposure of the chromophore binding surface as the result of chromophore relocation/reorientation (Song *et al.*, 1979; Hahn & Song, 1981).

이를 활성화시킴으로서 핵속으로 자유로이 드나들 수 있는 신호전달물질을 생산하는 방법.

다섯째 Pfr이 세포막 혹은 thykaloid 막과 작용함으로서 막의 성질 및 구조를 변화시키고 따라서

적색광에 비교적 빠른 반응을 유도하는 방법.

이상의 모든 모델에서 Pfr과 그 수용체(receptor 혹은 membrane)간의 특이한 상호작용이 초기분자반응(primary molecular event)으로 필요하며, 궁극적으로는 고등식물의 적색광 신호에 대한 표현이 이루어지게 된다. 본란에서는 이러한 측면을 가능한 실험적 결과를 중심으로 논해보고자 한다. 제한된 사간과 지면관계상 광범위한 문헌총설대신에 필자의 연구실에서 최근 이루어진 결과를 중심으로 Pfr의 합리적인 모델과 그 성질에 대하여 알아보자.

Pr과 Pfr의 차이점

비교적 확실히 밝혀진 Pr 발색단(chromophore)의 구조(그림 3)와는 달리 Pfr 발색단의 화학구조는 많은 연구에도 불구하고 (Rüdiger, 1980; Lagarias & Rappoport, 1980; Sarkar & Song, 1981a) 확실히 알려져 있지 않다. 이것은 Pfr 분자가 불안정하여 암소(dark)에서도 열역학적으로 Pr로 변환되기 때문이다. 그러나 Pr과 Pfr 발색단의 구조(conformation 내지 configuration)는 거의 유사하리라 믿어진다. 이러한 결론은 본 연구실에서 행할 분광분석 결과로 부터 추정될 수 있는 바, Pr 및 Pfr 공히 Q띠와 B띠의 oscillator strength 비($f_{Qx,y}/f_{Bx,y}$)가 거의 1 (unity)에 가까운 사실에 근거한다. 후자의 최대흡광 파장(λmax)의 적색이동(red shift)은 그림 3에서 도시한 바와 같이 ring A 양성자의 phototautomeric shift로 설명될 수 있다. 한편 Pr에서 Pfr로의 광변환에 따라 phytochrome의 CD 스펙트라는 큰 변화를 보인다. 즉 Pfr의 유도광활성(induced optical activity)은 발색단의 흡수부분에서 크게 약화된다(Song *et el.*, 1979; Song chae, 1979). Pr을 변성시키면 660nm의 강한 Pr CD signal이 quench되며 (Kim & Song, unpublished results) 그 CD 부호(sign)가 바뀌어진다(Brandlmeier, Lehner & Rüdiger, 1981). 이러한 CD 변화는 발색단 ring A의 chirality와 conjugated ring system의 helecity에서의 변화에 기인된다고 볼 수 있다. Pfr 발색단의 흡수부분의 CD signal은 Pr의 그것에 비하여 거의 무시될 수 있을 정도로 약하다. 이러한 결과는 Pr 발색단과 단백질간의 상호작용에 의한 유도광활성이 Pfr의 그것보다 훨씬 강함을 의미한다. 정성적으로 말하면 발색단과 apoprotein 간의 소수성결합(hydrophobic bonding)과 수소결합이 Pfr 보다 Pr에서 훨씬 강하다고 볼 수 있다. 그밖에도 아래에 논할 여러 결과들도 이 결론에 일치함을 보여준다.

그림 3 에서는 solvent isotope effeect에 의해 정성적으로 증명된 바 있는 (Sarkar & Song, 1981e) Pr→Pfr 광변환의 반응메카니즘을 도시하였다. 메카니즘 A는 발색단 ring A와 apoprotein 간의 thioether 결합이 Pr→Pfr 광변환에 따라 유리됨을 보여준다. 이 메카니즘은 propionic acid side chain 중 하나가 Pr 및 Pfr 형둘다 그 단백질과 공유결합되어 있고 (cf. Rüdiger, 1980; Killilea, Ocarra & Murphy, 1980), Pfr 형이 하나 더 많은 -SH group을 갖고 있다는 (Hunt & Pratt, 1981) 가정하에 가능하다. 이 메카니즘에서는 Pfr 형의 발색단과 apoprototein 표면과의 결합이 약화됨을 알 수 있다. 한편, 메카니즘 B는 Pfr 형에서 thioether 결합이 그대로 유지되며, 발색단의 propionic acid와 단백질과의 공유결합이 없는 상태(Lagarias & Rappoport, 1980)를 가정한 것이다. 이 메카니즘에서는 Pfr 발색단이 ring D에서의 수소결합이 phototautometrically 파괴됨으로서 그 apoprotein으로 부터 느슨하게 된다. 여기에서 Pfr의 발색단 구조(conformation/configuration)가 Pr의 그것과 수소결합 등을 통해 동일하게 유지됨을 주목할 필요가 있다(그림 1).

CD 분광분석과 그림 3 에서 제시된 메카니즘에 의한 Pr 및 Pfr phytochrome의 발색단 topography를 증명하기 위한 방법의 하나로 발색단과 외부에서 첨가한 시약사이의 상대적 화학반응 속도를 비교할 수 있다. 즉 보다 노출된 발색단이 보다 빠른 반응속도를 보일것이 기대되기 때문이다.

Pr 및 Pfr의 Micromola 농도의 과망간산과의 산화반응속도 정수를 보면 각각 1.2×10^5 및 1.0×10^6 $M^{-1}S^{-1}$로서 (Hahn, Kang & Song, 1980) Pfr이 10배정도 빠른 반응을 보인다. Micromolar 농도의 산화제에서 단백질의 손상은 거의 일어나지 않는다(Hahn *et al.*, 1980; Jung *et al.*, 1980), 그림 3은 과망간산보다 훨씬 반응성이 약한 borohydride에 의한 Pr 및 Pfr의 환원반응결과를 보여주고 있는 바 비교적 단백질의 결합 crevice에 깊숙히 파묻혀 있는 Pr 발색단에 비해 Pfr 발색단은 외부로 훨씬 노출되어 있음을 알 수 있다. 또한 Pr 및 Pfr 발색단의 모델화합물들(bilirubin, biliverdin, phycocyanin 등)은 과망간산 및 borohydride와의 산화, 환원반응에 거의 비슷한 감도를 보인다(Hahn *et al.*, 1980).

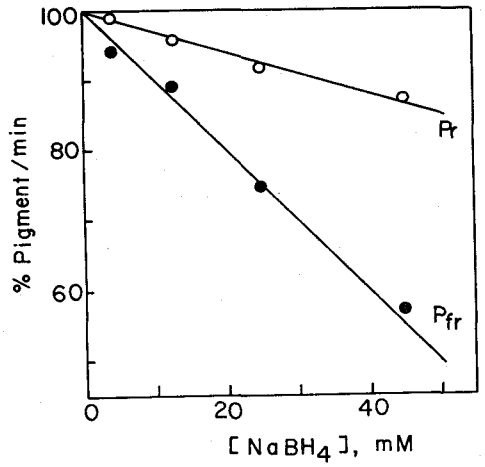

Figure. 4. The borohydride reduction of Pr and Pfr at 298K, pH 7.8 in 0.1M phosphate buffer. The ordinate scale represents initial rates of reduction; % pigment remaining was calculated after 1 min of reduction. (T.-R. Hahn & P.S. Song, unpublished).

이상의 발견이외에 Pfr phytochrome은 다음과 같은 특성을 보인다. (i) 양이온에 의한 Pfr의 침전성(pelletability) 증가 (Quail, 1978). (ii) Pfr의 소수성막조직과의 결합하려는 경향 (Marmé, 1977). (iii) 녹두조직에서 Pr에서 Pfr로 광변환 시킴에 따라 acetylcholine과 같은 charged species의 결합형태로 부터의 해리(Jaffe, 1970). (iv) 금속이온, N-ethyl Maleiimide 및 P-mercuribenzoate에 대한 Pfr의 Pr 보다 높은 반응성(Pratt, 1980에 의한 review를 보라). (v) 5M urea 존재하에서 Pfr이 Pr 보다 훨씬 급격히 bleach 됨 (Butler, Siegelman & Miller, 1964). (vi) Pfr이 blue dextran agarose에 소수력(hydrophobic force)을 통해 우선적으로 결합함(Smith, 1981). (vii) Pfr이 Pr에 비해 buffer 용액에 훨씬 덜 용해함. 이러한 모든 현상이 Pr에 비해 Pfr 발색단이 보다 노출되어 있으며 Pfr 형으로 됨으로서 소수성이 증가되는 특성을 보여준다.

이상을 요약하면 Pr→Pfr 광변환은 그 발색단이 어느정도 유연성을 가지고 밖으로 노출되도록 함으로서 결과적으로는 Pfr 단백질에 새로운 소수성 표면을 만들게 된다. 이렇게 생리적으로 활성화된 광형태적(photomorphogenic) 수용체로서의 Pfr에 대한 분자모델이 제시된 바 있다(Song *et al.*, 1979; Song, 1980). 다음에는 제시된 모델에 대하여 필자의 연구실에서 최근 얻어진 결과를 중심으로 보다 자세히 알아보기로 하자.

Table 1. Effect of the Pr→Pfr phototransformation on the fluorescence of bound ANS[a]

Phytochrome (μM)	ANS (μM)	Fluorescence Enhancement[b] (%)
1.6	0	0[c]
1.6	390	5.1[c]
1.0	500	6.2[c]
1.0	1000	9.6[c]
0.053	0.5	0[d]
0.352	0.5	3[d]
0.528	0.5	14[d]
0.88	0.5	31[d]

[a]Conditions as described in the caption to Fig. 5
[b]Defined as $\triangle I_F^{Pr\rightarrow Pfr} \times 100/I_F^{Pr}$, where I_F^{Pr} and $\triangle I_F^{Pr\rightarrow Pfr}$ represent ANS fluorescence intensities before and after Pr→Pfr phototransformation; $\triangle I_F^{Pr\rightarrow Pfr}$ was measured immediately upon Pfr formation from Pr incubated for 2~5h in the presence of ANS. Average of ten measurements.
[c]Using Pr from "Affi-gel" procedure with highest purity(virtually free of contaminant proteins).
[d]Using Pr obtained from "conventional" procedure and values corrected for ANS fluorescence attributable to contaminant proteins.

Pfr의 소수성 모델(hydrophobic model)

Pfr의 소수성 모델은 그림 5에 도시하였다. 표시된 바와 같이 Pr→Pfr 광변환의 역할은 Pfr 단백질에 독특한 소수성 표면을 생성하는 것이다. 앞서 설명한 바와 같이 propionic acid group과 단백질간의 공유결합 문제가 완전히 해결되지 않았으므로 두가지 가능한 모델을 모두 제시하였다.

8-anilinonaphthalene-1-sulfonate (ANS)는 잘 알려진 소수성 형광표지물질로서 단백질의 소수성 부분에 결합하여 강한 형광을 발산한다. 만일 그림 5에 제시된 모델이 맞다면, 노출된 소수성 표면을 가진 Pfr 분자는 ANS와 우선적으로 결합할 것이 기대된다. 예상한 바와 같이 ANS는 Pr과 Pfr 공히 결합되나 Pfr에 보다 높은 친화력을 갖는다. 즉 ANS는 Pfr과 결합하여 그 형광강도가 증대된다(Table 1, Hahn & Song, 1981). 이러한

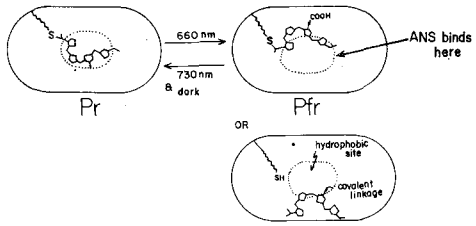

Figure. 5. The hydrophobic model for the Pfr form of phytochrome. The site of ANS binding is indicated by solid arrows in the Pfr molecule (two alternative models shown). Note that the gross conformations of Pr and Pfr are identical. (Redrawn from Hahn & Song, 1981).

형광강도 증대외에도 ANS 존재하의 Pr→Pfr 광변환에 따른 ANS의 형광편광 및 형광수명값의 상당한 증가가 확인되었다(Hahn & Song, 1t81). 이러한 결과는 ANS가 Pr과 Pfr 두곳 다 갖고 있는 비선택적 결합부분 이외에 Pfr 분자에 추가로 마련된 소수성 표면에 선택적으로 결합하기 때문인 것으로 설명된다.

Pfr의 소수성부분에 대한 ANS의 선택적 결합은 또한 Pfr의 흡수스펙트럼, 광변환(photoreversion) 및 암변환(dark reversion) 속도에 영향을 미칠 것으로 기대된다. 그림 6은 ANS 존재하의 Pr의 흡수스펙트럼 및 Pfr 조의 광변환을 보여주고 있다. 보는 바와 같이 ANS의 결합은 Pr의 흡수스펙트라에 대하여는 비교적 적은 영향을 미친다(그러나 1mM 이상의 ANS 농도에서는 상당한 정도의 hypochromism을 볼 수 있다). 그러나 Pr로 부터 생성된 Pfr은 ANS의 농도가 증대됨에 따라 급격히 bleaching 되어, 2mM의 ANS 농도에서는 Pfr의 흡수는 거의 볼 수 없다. ANS에 의한 이와같은 스펙트라의 섭동(perturbation)은 Pfr 분자의 소수성 부분에 ANS가 결합하여 부분적으로 단백질 crevice와 결합되어 있는 Pfr 발색단을 완전히 외부로 노출되게 함으로서 발색단의 semicircular 구조를 유지시키고 있는 수소결합 및 소수성결합을 파괴하기 때문인 것으로 생각된다(그림 5 참조 Song & chae, 1979). 따라서 Pfr의 ANS 결합은 스펙트럼 섭동 즉 bleaching을 유발하게 되는 것이다. 이것은 Pfr을 urea 혹은 ionic detergent로

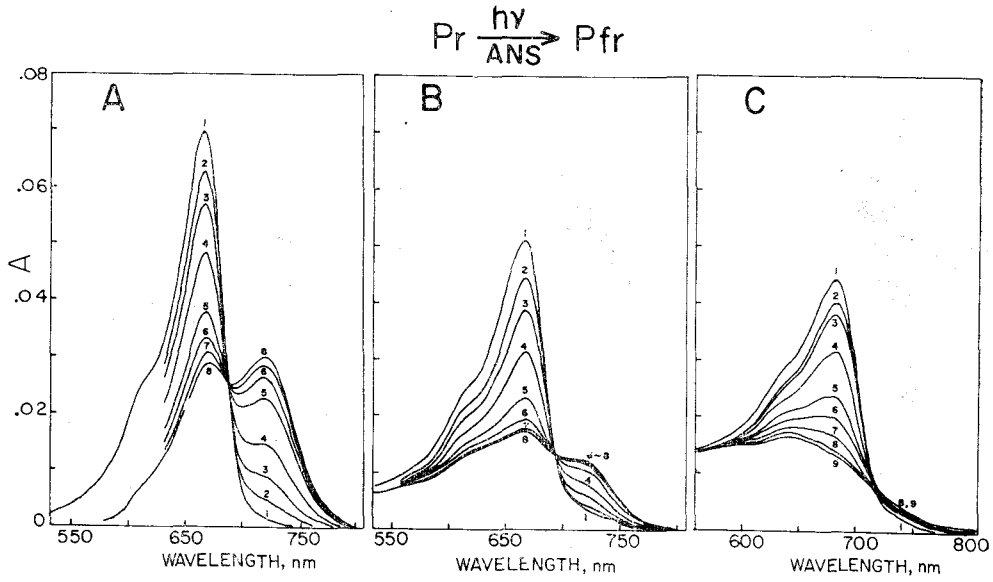

Figure. 6. Changes in the absorption spectra of phytochrome(Pr, 1μM) in phosphate buffer, pH 7.8, 273K, as a function of irradiation with 660-nm light (fluence rate at 7.5 W/m^2) in the presence (B & C) and absence (A) of ANS: Panel (A), 0mM ANS; panel (B), 1.0mM ANS; panel C, 2.0 mM ANS. In each panel, spectra 1 through 8 represents progressive irradiation time from 0 s through 92.4s, respectively, and spectrum 9 in panel (C) for 210s. (Redrawn from Hahn & Song, 1981).

변성시켰을 경우와 흡사하다(Kim & Song, to be published). 이러한 ANS와 anionic detergent에 의한 Pfr의 스펙트럼 변성은 발색단과 단백질간의 수소결합을 파괴함으로서 일어나는 것으로 믿어지며 소수성부분 이외에도 음이온 부분이 필요한 것으로 생각된다. Pfr 발색단이 완전히 외부로 노출되고 유연성을 갖게되면 열역학적으로 보다안정되고 장파장의 적색광흡수부분(far-red region)으로부터 청색이동한 곳에 흡광대를 갖는 환형구조(cyclic conformation)로 변형될 것으로 생각된다(Song *et al.*, 1979; Song & chae, 1979).

Pfr 용액에 ANS를 직접 첨가하면 Pfr의 장파장의 적색광(far-red) 흡수대가 즉각적으로 bleach됨을 알 수 있다(그림 7). 이것은 그림 6에서 보여준 Pfr 흡수대의 bleaching이 Pr에서 Pfr로의 광변환동안 생성된 중간물질들 (intermediate)의 trapping에 의한 것이 아님을 표시한다. 흥미있는 사실중의 하나는 완전히 bleach된 Pfr 용액에 장파장의 적색광(730nm)을 조사하면 여전히 Pr이 생성될 수 있다는 사실이다. 이것은 완전히 bleach된 Pfr/ANS 착물과 유리 Pfr (Pr 형으로 변환될 수 있는) 사이의 동적 평형이 이루어진 것으로 설명될 수 있다(Hahn & Song, 1981).

phytochrome 발색단의 소수성 crevice에 대한 ANS의 결합은 또한 광변환 및 암변환(dark reversion)의 속도를 변화시킬 것으로 기대된다. 예를들면 Pr→Pfr의 정방향으로의 광변환은 ANS가 발색단의 결합 crevice로 부터의 재배치(reorientation)를 도와 경쟁적 촉진제 (competitive activator)로 작용함으로서 촉진될 것이 예상된다. 한편 Pfr의 Pr로의 역변환(역광변환 혹은 암변환)은 ANS가 Pfr 발색단이 Pr로 돌아올때 차지하여야 할 결합부분을 이미 차지하여 경쟁적 억제제로 작용할 것이므로 억제될 것이 예상된다. 이러한 모든 예상은 Table 2 및 3에서 보여주는 바와같이 실험적으로 확인 증명되었다.

상세한 Pfr의 소수성 모델

앞장에서 Pfr phytochrome의 소수성 모델에 대하여 ANS를 사용한 형광스펙트가, 흡수스펙트라 및 광변환 및 암변환 속도론에 관하여 논한 바 있다. 이곳에서는 이 모델에 대하여 보다 상세한 분

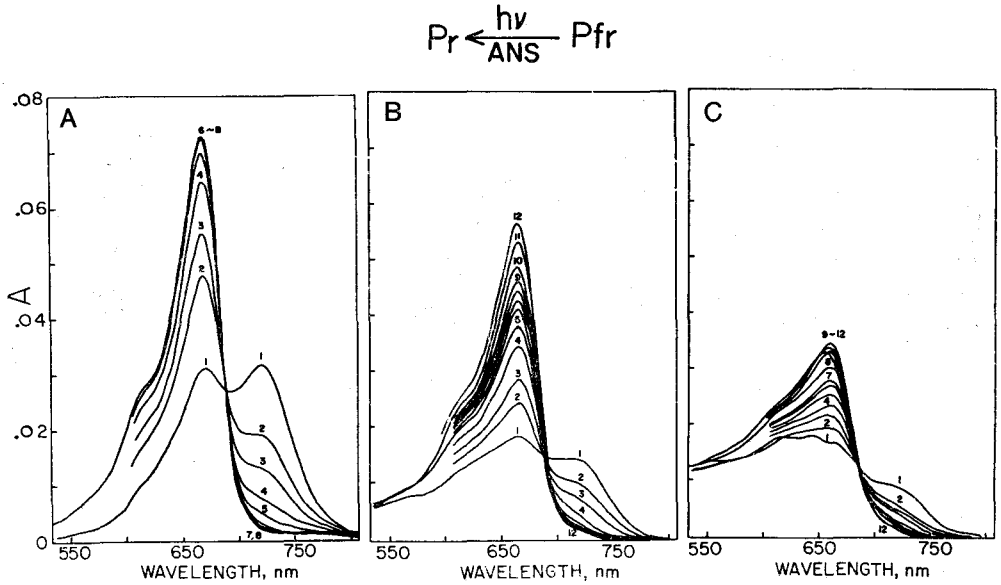

Figure. 7. Changes in the absorption spectra of phytochrome(Pfr, 0.8μM) in phosphate buffer, pH 7.8, 273K, as a function of irradiation with 730-nm light (fluence at 1.6kW/m^2), in the presence (Panels B & C) and absence (Panel A) of ANS; Panel (A), 0mM ANS; Panel (B), 1.0mM ANS and Panel (C), 2.0 mM ANS. In each panel, spectral 1 through 8 represents progressive irradiation time from 0s through 92.4s, respectively, and spectra 9 through 12 from 210 through 1410s, respectively. (Redrawn from Hahn & Song, 1981).

Table 2. Rate constants obtained from linear regression analyses of the kinetics of the phototransformations of phytochrome (1 μM) in phosphate buffer (pH 7.8) at 273K with 660 nm (7.5 W/m^2) and 730nm (1.6kW/m^2) light, as a function of ANS concentration[a].

[ANS] (μM)	Pr→Pfr		Pfr→Pr		
	k_0 (s^{-1})	relative k_0	k_1(s^{-1})	k_2($s^{-1}\times10^2$)	k_2 component[b] (%)
0	0.098	1.0	0.24	0	0
50			0.22	0	0
100			0.22	0	0
200	0.114	1.17	0.27	7.52	22
500	0.123	1.26	0.28	2.23	28
1000	0.131	1.34	0.27	1.97	57
1500	0.095	0.97	0.26	0.97	63
2000	0.072	0.73	0.28	0.98	66

[a]Correlation coefficient for the rate constants listed ranged from 0.997 to 1.00.
[b]k_1 and k_2 for faster and slower components, respectively, and amplitude of the latter as resolved by the peeling procedure (Van Liew, 1967).

Table 3. Rate constants obtained from linear regression analyses of the kinetics of dark-reversion (Pfr→Pr) of phytochrome in phosphate buffer, pH 7.8, at 273 K, in the presence of ANS.

[phytochrome] (μM)	[ANS] (mM)	[dithionite] (mM)	k_1 ($s^{-1}\times10^4$)	k_2 ($s^{-1}\times10^6$)
2.4	0	0	7.23	7.71
2.1	0.625	0	7.69	7.60
2.1	1.250	0	7.70	4.92

자 구조를 필자 실험실에서 최근 이루어진 연구결과를 중심으로 알아보기로 하자.

첫째 소수성 모델의 결정적 특징, 즉 Pr의 Pfr로의 변환에 따른 발색단의 재배치 문제를 살펴보자. Pfr에서 그 발색단은 과연 Pr phytochrome의 발색단 결합 crevice에 대하여 상대적으로 재배치되느냐? 가장 확실한 해답은 역시 phytochrome 분자의 X-ray 결정분석 자료로 부터 나올 수 있다. 불행히도 현재 그러한 X-ray 분석자료는 유효하지 않다. 그러나 이상의 의문은 아래에서 논할 phytochrome 분자의 분광학적 분석에 의해 긍정적으로 해답 가능하다(Sarkar & Song, 1981a).

phytochrome 분자의 발색단 결합부분 (주위)에는 적어도 한개 이상의 tryptophan residue가 존재한다(Song *et al.*, 1979) 따라서 Pr 및 Pfr 공히 존재하는 tryptophan 분자에 대하여 발색단의 상대적 재배치를 측정하는 것이 가능하다. 즉 tryptophan의 들뜬 상태로 부터 발색단으로의 Förster-type 메카니즘에 의한 에너지 전달을 측정함으로서 발색단의 재배치를 측정할 수 있다. 에너지 전달이 50% 되는 임계 에너지 전달거리(critical energy transfer distance, R.)가 에너지 방출주개(energy emitting donor; tryptophan)와 흡수받게(acceptor; 발색단) 사이의 스펙트럼중첩(spectral overlap)으로부터 측정된다. ^{1}Trp-^{1}Pr과 ^{1}Trp-^{1}Pfr 전달쌍 [여기에서 1은 단일 들뜬상태 (singlet excited state)를 표시함]에 대한 R_0 값은 거의 동일하여 28Å 이다(Song *et al.*, 1979). ^{3}Trp-^{1}Pr (Bx,y)과 ^{3}Trp-^{1}Pr (Qx) 에너지 전달과정에 대한 R_0 값은 각각 32.28Å 및 36.34Å이며, 한편 ^{3}Trp-^{1}Pfr (Bx,y) 및 ^{3}Trp-^{1}Pfr (Qx) 쌍의 값은 각각 31.87 및 35.82Å 이다. [여기에서 3은 삼중들뜬

상태(triplet excited state)를 표시함]. ^{3}Trp로부터 ^{1}Pr 및 ^{1}Pfr로의 에너지 전달 R_0 값이 각각 두 값인 것은 phytochrome의 tryptophan 인광 스펙트럼이 phytochrome 발색단 스펙트럼의 자외선 근접흡광대(Bx,y) 및 가시광선 흡광대(Qx) 둘다 중첩되기 때문이다. 중첩 스펙트럼과 주게 및 받게 전이 쌍극자(transition dipole)가 randomly 배치되었다는 가정하에 측정된 R_0 값으로 부터 에너지 전달 확율이 Pr 및 Pfr 둘다 거의 동일할 것임을 예상할 수 있다. 한편 만일 tryptophan 분자를 포함한 단백질 crevice에 Pr 발색단이 단단히 결합되어 있고 Pfr에서는 발색단이 재배치되어 노출됨으로서 보다 유연성을 갖게된다면 (이경우 주게 및 받게 쌍극자가 randomly 배치되어 있지 않음), tryptophan에서 발색단으로의 에너지 전달 확율이 달라야 한다. 이것이 아래에 설명할 에너지 전달 과정으로 실험되었다(Sarkar & Song, 1981a).

77°K에서 Pr의 형광수명은 적색광으로 들뜨게 되었을 때 (발색단에 의한 흡수) 1 nanosecond 이하이다. Pr 분자가 자외선으로 들뜨게되면(290nm는 거의 tryptophan에 의한 흡수) Pr 발색단의 형광발산은 0.16초의 반감기를 보여준다. 따라서 이러한 긴 형광수명은 인광발광 tryptophan으로부터 Pr 발색단으로의 에너지 전달, 즉 삼중 tryptophan에 의해 sensitize 된 지체된 발색단의 형광임을 표시한다. 비슷한 지체된 Pfr의 형광은 낮은 형광수율 또는 사용된 detector system의 감도 문제로 측정할 수 없었다. 그러나 Pfr에서의 tryptophan 인광의 반감기가 0.28초인 점에 비추어, 에너지 전달은 Pfr 분자에서 크게 억제됨을 알 수 있다.

이상의 결과는 tryptophan residue에 대하여 발색단의 상대적 배치가 Pr과 Pfr 사이에 크게 다름, 즉 앞장에서 언급한 모델을 지지함을 강력히 시사한다. Indol의 인광은 out-of-plane polarized 되어 있다(Song & Kurtin, 1969). 따라서 Pfr 분자에서는 발색단과 tryptophan의 plane이 평행한 배치를 하고 있던가 혹은 주게 받게 전이쌍극자가 거의 서로 수직하고 있음을 알 수 있다.

발색단의 재배치는 또한 FMN을 외부첨가한 실험으로 증명되었다(Sarkar & Song, 1981b). 그림 8은 첨가한 FMN의 존재하에 Pr의 광변환에 대한 청색광 조사 영향을 표시하였다. 청색광 조사에 따른 Pr의 감소율은 FMN의 증가에 따라 증대된다. 그림 9는 FMN 존재하에 Pfr의 역광변환에

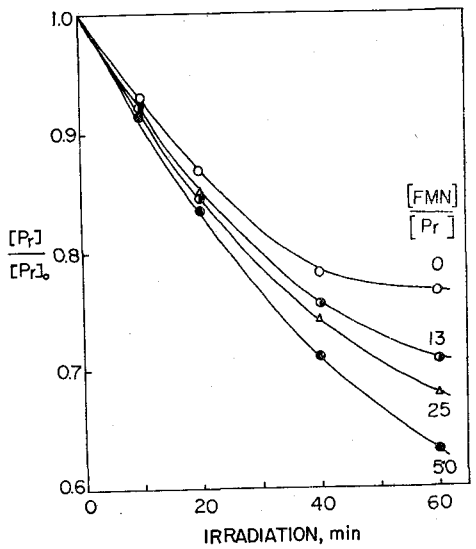

Figure. 8. The phototransformation of phytochrome (Pr, 4μM) in 0.1M phosphate buffer, pH 7.8, with blue light (442nm, fluence rate 0.6 W/m^2) at 278 K, in the presence of molar excesses of FMN added. $[Pr]_0$ and [Pr] are concentrations before and after irradiation with 442-nm light which is exclusively absorbed by FMN, respectively. (Redrawn from Sarkar & Song, 1981c).

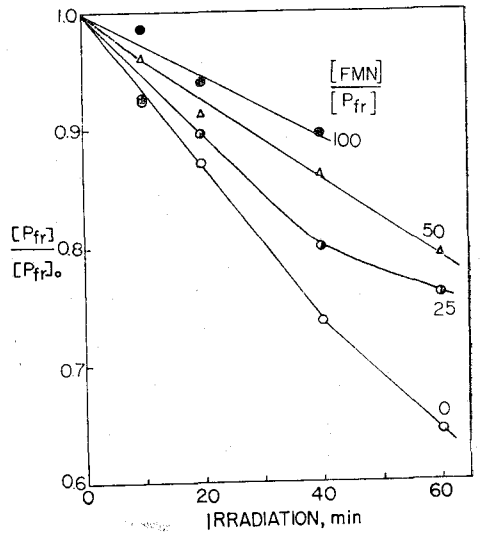

Figure. 9. The photoreversion of Pfr (4μM) in phosphate buffer, pH 7.8, with blue light (442nm, fluence rate 0.6W/m^2) as a function of molar excess of FMN which exclusively absorbs 442-nm light. (Redrawn from Sarkar & Song, 1981c).

대한 청색광조사 영향을 보여주고 있는 바 FMN의 농도증가에 따라 변환율은 감소한다. 한편 FMN 존재하에서의 적색광 및 장파장의 적색광(far red light)에 의한 광변환에는 아무런 영향도 보여주지 않았으며 단지 매우 높은 FMN 농도에서 Pfr의 역광변환이 약 15% 억제됨을 알 수 있었다.

이상의 결과들은 flavin (주게)/phytochrome(받게) 착물 내에서의 에너지 전달에 기인된 것으로 설명될 수 있다. Pr과 FMN 간의 착물화(complexation)는 고감도 single beam spectrophotometer로 즉각 측정될 수 있다(Song, Sarkar, Kim & Poff, 1981). 반응속도 결과로 부터도 flavin 부분이 Pr apoprotein에 에너지 전달이 용이하도록 Complex 되었음을 알 수 있다. 에너지 전달은 flavinphytochrome 혼합물의 형광수명을 측정함으로서도 증명된다. 예를들면 3μM Pr과 15μM flavin의 혼합물은 두 종류의 형광수명값을 갖는데 그중의 하나는 3.34 nanosecond 이다(유리 flavin은 4.63 nanosecond). 한편 3μM Pfr과 15μM flavin은 4.89 nanosecond의 한 값만 보여준다. 이것은 단일들뜬 상태의 flavin 으로 부터 Pr 발색단으로의 에너지 전달이 Pfr의 그것보다 훨씬 효율적임을 의미한다. 이러한 차이점은 Pfr에서의 발색단 재배치로 설명된다. 즉 Pfr에서는 주게(flavin)와 받게(발색단)의 전이쌍극자가 수직(orthogonal)하고 있기 때문이다. 여기에서 flavin에서 phytochrome으로의 에너지 전달이 50% 되는 거리 즉 임계 에너지 전달거리는 flavin-Pr과 flavin-Pfr 쌍에 대하여 각각 25.8Å 및 22.2Å으로서 거의 동일하다. 이러한 결과는 앞서 설명한 tryptophan 에너지 전달 결과와도 일치한다.

앞서 설명한 바와 같이 청색광에 의한 Pr→Pfr 광변환은 FMN에 의해 증대된 반면 그 역광변환은 FMN에 의해 억제되었다. 이것은 FMN으로부터 Pfr 발색단으로의 에너지 전달 효율이 Pr의 그것보다 훨씬 떨어지기 때문이며, 에너지 전달이 되지 않은 결합 및 유리 FMN의 거름효과(screening effect)로도 설명될 수 있다. 또한 과잉 FMN이 앞서 설명한 ANS에서와 같이(Hahn & Song, 1981) Pr→Pfr 광변환에 따라 비워진 발색단 결합부분을 차지함으로서 그 역광변환을 경쟁적으로 억제하기 때문일수도 있다(그림 5 참조).

발색단의 결합 crevice 및 tryptophan residue로부터의 재배치는 결과적으로 Pfr 분자에서의 tryptophan residue의 선택적 노출이 기대된다. 이러한

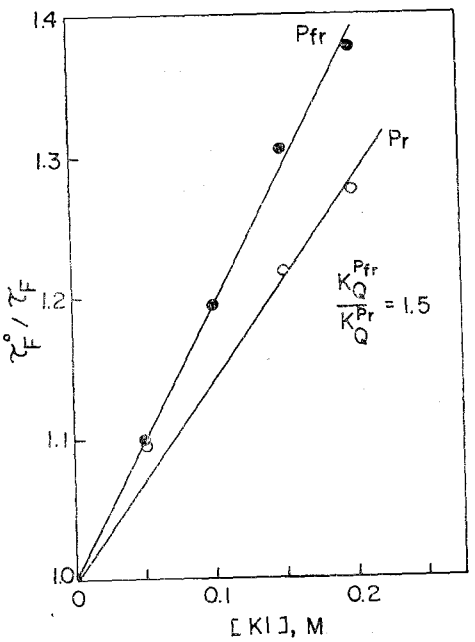

Figure. 10. The Stern-Volmer plots for the fluorescence quenching of tryptophan residues in Pr and Pfr at 278 K, as a function KI. The ratio of the quenching constants for the two plots is 1.5, indicating that the tryptophan residues in Pfr are more exposed than those in Pr. (Redrawn from Sarkar & Song, 1981a).

예상은 그림 9에서 보여주는 바와같이 tryptophan 형광의 KI에 의한 Stern-Volmer quenching으로 확인되었다. Pfr의 tryptophan 형광은 KI에 의해 Pr의 그것보다 1.5배나 빨리 quench 되는데 이것은 Pfr의 tryptophan residue가 Pr의 그것보다 훨씬 더 노출되어 있음을 암시한다.

Tryptophan residue가 상대적으로 얼마나 더 노출되어 있는지의 정량적인 계산은 그림 11에서 보여주는 바와 같이 수정 Stern-Volmer로부터 얻을 수 있다.

$$IF°/\triangle IF = (1/facc) + (1/facc\ [KI]K_Q)$$

여기에서 IF°는 KI 무존재하에서의 형광강도, △IF는 KI 농도 증가에 따른 형광강도의 감소치, facc는 tryptophan residue의 노출 fraction을 각각 나타낸다. 그림에서 보는 바와 같이 Pr 및 Pfr의 facc 값은 각각 0.45 및 0.72로 계산되었다. 따라서 형광 quenching 결과 또한 phytochrome의 소수성모델과 잘 일치됨을 알 수 있다(Pfr; 그림 5)

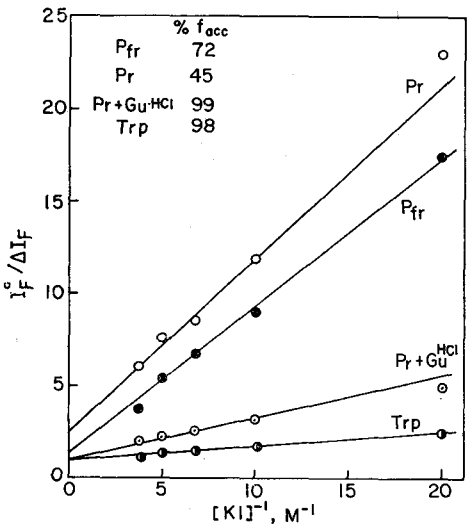

Figure. 11. Double-reciprocal plots for the fluorescence quenching of free tryptophan, Trp residues in denatured (Pr+guanidine hydrochloride) and native Pr and Pfr in phosphate buffer, pH 7.8, as a function of KI concentration at 278K. The % facc values are shown. (Redrawn from Sarkar & Song, 1981a).

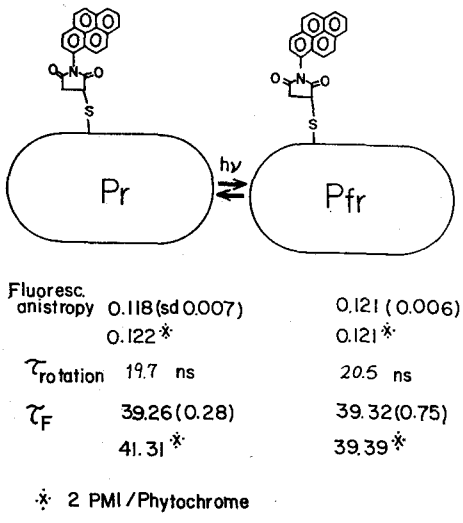

Figure. 12. Fluorescence anisotropy, rotational relaxation times and lifetimes of pyrene-N-maleimide-labeled Pr and Pfr in 0.1M phosphate buffer, pH 7.8, at 298K. (Redrawn from Sarkar & Song, 1981d).

Pr과 Pfr 사이에 큰 구조상의 (gross coformational) **차이가 있는가?**

서언에서 지적한 바와 같이 Pr→Pfr 광변환에 따라 phytochrome 단백질 구조에 큰 변화가 일어난다면 이것은 생리적으로 중요한 의미를 갖는다. 이제 우리는 phytochrome 단백질에 큰 구조변화가 일어나는지의 여부를 살펴보기로 하자.

앞서 두장으로 부터 설명한 phytochrome의 광변환에 따른 발색단의 재배치가 단백질의 발색단 결합부분 주위에 위치한 peptide에 적어도 국부적으로나마 부분적인 구조변화를 유발할 것으로 기대된다. 그러나 과연 단백질의 구조상 큰 변화가 일어날 것인가? Pr과 Pfr 분자 사이에 외부 모양에서의 큰 차이가 있을 것인가? 이러한 의문들에 대하여 본 실험실에서 최근 연구된 결과를 중심으로 알아보자 (Song, 1980b; Sarkar & Song, 1981 d).

Pr 분자를 그림 12에서 보는 바와 같이 표지물질로서 -SH group에 선택적으로 반응하는 형광물질, pyrene Maleiimide (PMI)로 공유결합시켰다. 표지된 PMI는 긴 형광수명을 가졌음에도 불구하고 phytochrome과 같은 큰 분자(120,000 as Monomer and 240,000 as dimer)에서 기대되는 큰 rotation relaxation time 값을 보여주지 않는다. 얻어진 짧은 값은 PMI-peptide 결합부분이 부분적으로 자유롭다는 것을 반영한다. 그러나 형광편광, 형광수명 및 rotational relaxation time은 Pr 및 Pfr 공히 같은 값을 보인다(그림 12). 이들 값들은 단백질의 부분적인 혹은 전체적인 구조변화에 예민한 반응을 보이므로, 두 형태의 phytochrome에서 보여준 유사한 값은 Pr에서 Pfr로의 변환이 단백질의 구조에 큰 영향을 주지 않는다고 볼 수 있다.

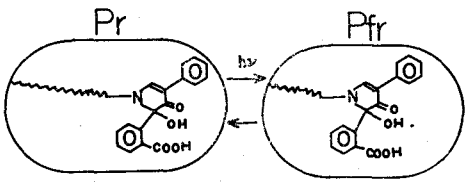

Figure. 13. The rotational relaxation times for Pr and Pfr labeled with fluorescamine in phosphate buffer, pH 7.8, at 298K. (Redrawn from Sarkar & Song, 1981d).

Fluorescamine은 amino group에 작용하는 또다른 형광표지물질로서 짧은 relaxation time 값 외에 긴 값을 보여주고 있는데 Pr 및 Pfr에 대하여 각각 100.2 및 101.9nS이었다(그림 13). 즉 Pr 및 Pfr에 대하여 거의 동일한 값을 나타내고 있으므로 Pr과 Pfr의 단백질 모형이 유체역학적으로 거의 유사함을 시사한다.

이상의 결과로 부터 Pr→Pfr 광변환에서 우선적으로 일어나는 변화는 발색단의 재배치와 Pfr의 소수성 표면노출로 결론지을 수 있다. 그러나 앞서 설명한 바와 같이 발색단의 재배치에 따른 지엽적인 또는 부분적인 구조변화가 일어날 가능성이 많다.

최근 예비측정된 바 있는 Pr 및 Pfr (small mol wt.)의 360MHz NMR 결과도 몇몇 아미노산 residue와 발색단이 Pfr형에서 노출된다는 사실을 보여주고 있다. 특히 NMR 스펙트라의 6~9ppm 부분에 위치한 tyrosyl 및 histidyl residue가 Pfr에서 보다 노출됨을 알 수 있다. 삼중수소수 용액에서 Pfr이 Pr 보다 더 많은 H^+-T^+ 교환이 일어난다는 사실(Hahn & Song, 1982)은 NMR 결과와 잘 일치되고 있다. 이상의 예비실험 결과는 histidyl 및 tyrosyl residue가 Pfr에서 더 노출되어 있고 (Hunt & Pratt, 1981) tyrosyl hydroxyl H^+가 Pfr에서 D^+와 치환된다는 최근의 발견(Song *et al.*, 1981)과도 잘 일치된다. 몇몇 아미노산 residue 및 발색단의 노출에 대한 추가적 증명으로 D_2O에서 phytochrome의 photocycling이 Pr의 형광수율과 Pfr의 광변환 및 암변환율을 증대시키는 사실로도 알 수 있다(Sarkar & Song, 1981e).

Pfr과 모델 수용체간의 상호작용

Pfr 단백질에 생성된 소수성표면(그림 5)은 Pfr과 기 수용체들 사이의 선택적반응에 중요한 결합부분으로 작용할 것이 기대된다. 그러나 아직 *in vive*에서 Pfr 수용체가 발견된 바 없다. 단지 Pfr의 소수성부분에 모델 수용체가 선택적으로 결합하는지 혹은 Pfr과 모델 수용체가 상호 어떠한 작용을 하는지를 살펴보는 것이 유익하리라 생각된다. 우리는 이미 Pfr의 소수표면과 ANS와의 상호작용에 대하여 살펴본 바 있다. ANS가 실제로 그 발색단의 결합부분에 결합한다는 것은 dithionite과 같은 환원제가 Pfr의 암변환을 촉진하는 작용부분에서 ANS와 경쟁한다는 사실로도 입증된다 (Hahn & Song, 1981).

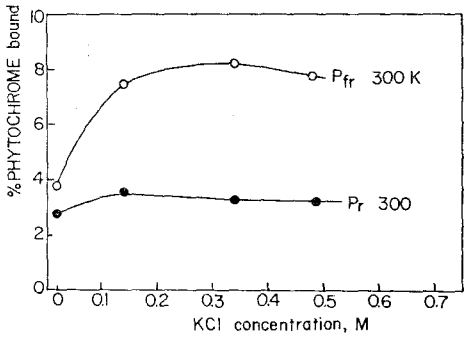

Figure. 14. The binding of phytochrome to unilamellar liposomes as a function of ionic strength (KCl) in 20 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 276K. (Redrawn from Kim & Song, 1981).

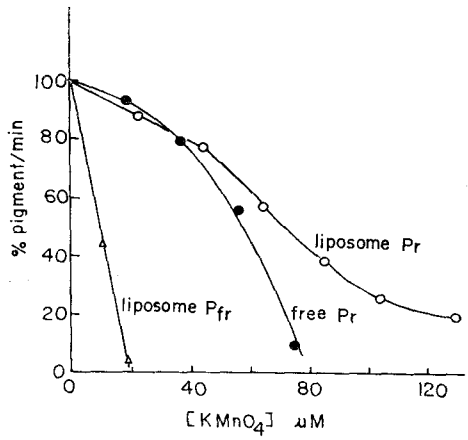

Figure. 15. The initial rates of oxidation of the phytochrome chromophore as a function of potassium permanganate in 20 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 276K. (I.S. Kim & P.S. Song, unpublished).

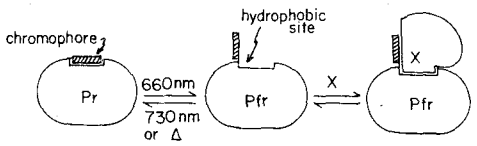

Figure. 16. The side view of the hydrophobic model of Pfr. X represents the Pfr receptor which is yet to be indenfied. (Redrawn from Song *et al.*, 1979; Song, 1980a).

phytochrome 작용의 초기반응이 Pfr과 세포막들(celluler membranes) 사이의 상호작용에 기인하는 것이라는 설이 높아가고 있다(See Marmé, 1977), 그러나 phytochrome과 세포의 막들 사이의 반응성질에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. 이 장에서는 liposome을 모델 system으로 사용하여 phytochrome의 결합성질을 연구한 최근 연구결과(Kim & Song, 1981)를 중심으로 알아보기로 하자.

Multilamellar liposome에 cholesterol의 함량을 높이면 Pfr에 우선적이긴하나 Pr 및 Pfr phytochrome의 결합을 공히 증대시킨다. 한편 Pfr의 unilamellar liposome에 대한 결합을 보면 phytochrome-bound liposome이 보다 직경이 큰 liposome으로 fusion 되는 것을 알 수 있다(Kim & Song, 1981). Unilamellar liposome에 대한 phytochrome의 결합은 ionic strength 에 의해 크게 영향받는다(그림14). 즉 Pfr의 결합은 일반적으로 ionic stregth 증가에 따라 증대되나, Pr의 결합은 특히 낮은온도(e.g 276K)에서 서서히 감소한다. 이러한 사실은 Pfr과 liposome의 결합은 소수성이나 Pr의 결합은 주로 소수성이 아님을 시사한다.

phytochrome과 liposome 결합의 topography를 알아보기 위하여 liposome에 결합된 phytochrome의 광변환 및 암변환을 살펴보면 결합 Pr의 Pfr로의 광변환은 증가한 반면 그 역변환은 억제되었다(Kim & Song, 1981). 이러한 역학적 성질은 앞서 설명한 바와 같이 ANS-bound phytochrome과 유사한 것임을 알 수 있다. 따라서 Pfr의 소수성 표면이 liposome의 lipid phase에 결합되어 있음을 알 수 있다. 한편 유리 Pfr에서 현저한 dithionite의 암변환 촉진효과는 결합 Pfr에서는 오히려 억제되었다. 따라서 phytochrome 이 liposome에 결합됨에 따라 dithionite의 결합부분이 liposome에 의해 파묻혀(buried) 짐으로서 dithionite가 도달하기 어려운 상태가 됨을 유추할 수 있다(Kim & Song, 1981).

만일 Pfr의 소수부분이 liposome의 lipid bilayer cor에 결합한다면 그 발색단이 aqueous phase에 노출될 것이 기대된다. 그림 14는 유리 및 결합 phytochrome의 발색단의 과망간산에 의한 산화반응 결과를 보여주고 있다. 즉 liposome-bound Pfr의 발색단이 liposome-bound Pr의 그것에 비해 훨씬 빨리 산화됨을 알 수 있다. 이와 유사한 결과는 borohydride 환원 반응에서도 볼 수 있다. 이러한 liposome-bound Pfr 발색단의 우선적 반응은 그 발색단이 즉각적으로 반응가능하도록 외부로 노출되어 있음을 의미한다.

흥미있는 사실로 Pfr이 귀리의 protoplast에는 우선적으로 결합되지 않는다는 사실이다(Kim & Song, 1981). 더구나 이 결합은 높은 ionic strength에서 크게 억제되므로 Pfr의 protoplast 외부와의 결합이 정전기적임을 알 수 있다. 따라서 Pfr의 소수성 모델은 특정한 세포막에만 선택적임을 나타내고 있다 하겠다.

結 論

아직 phytochrome 광변환의 실체와 Pfr과 그 수용체간의 상호작용이 미해결된채 남아있으나 Pfr이 Pr과 다른 중요한 특징중의 한가지는 이상에서 상술한 바와 같이 해결되었다고 볼 수 있다. 즉 Pfr 분자가 광변환의 결과로 소수성 표면을 노출한다는 사실이다. 이러한 소수성 표면은 모델 수용체 화합물 (ANS), 모델 세포막 (liposome) 및 protoplast와의 반응에 특이성을 보인다. 요약으로 그림 16에 상기 모델의 측면도를 묘사하였다(그림 5 참조).

제시된 모델로부터 수많은 생물학적으로 중요한 결과를 유추할 수 있다. 즉 첫째 Pfr과 그 수용체 사이의 반응결과로 Pfr의 흡수스펙트럼에 강한 스펙트럼 섭동이 일어날 것이 기대되고, 둘째 결합 phytochrome의 광변환 및 암변환율이 변화함에 따라 photostationary 평형이 이동될 것이며, 셋째 식물세포의 비선택적인 소수성물질이 Pfr에 결합됨으로써 그 발색단의 스펙트럼을 변성시킬 것이 기대됨으로써 식물의 종류에 따라 각각 다른 다양한 광형태 반응을 보이게 되는 것으로 설명될 수 있다.

參 考 獻 文

Brandlmeier T., Lehner H., and Rüdiger W.: (1981) *Photochem. Photobiol.*, **34**, 69~73.

Briggs W. and Rice H.: (1972) *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, **23**, 293~334.

Butler W.L., Siegelman H.W., and Miller C.O.: (1964) *Biochemistry*, **3**, 851~857.

Hahn T.R., Kang S.S., and Song P.S.: (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 1317~1323.

Hahn T.R., and Song P.S.: (1981) *Biochemistry*, **20**, 2602~2609.

Hahn T.R., and Song P.S.: (1982) *Biochemistry*, (in press)

Hunt R.E., and Pratt L.H.: (1980) *Biochemistry*, **20**, 941~945.

Jaffe M.: (1970) *Plant Physiol.*, **46**, 768~770.

Jung, J. Song, P.S. Swanson R., Paxton R., Edelstein M., and Hazen E.: (1980) *Biochemistry*, **19**, 24~32.

Killilea S.D., O'Carra P., and Murphy R.F.: (1980) *Biochem. J.*, **187**, 311~320.

Kim I.S., and Song P.S.: (1981) *Biochemistry*, **20**, 000~000 (in press).

Lagarias J.C., and Rapoport H.: (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4821~4828.

Lehrer S.S.: (1971) *Biochemistry*, **10**, 3254~3263.

Marme D.: (1977) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 173~198.

Mohr H.: (1972) "Lectures on Photomorphogenesis" Springer-Verlag, New York, pp. 23.

Pratt L.H.: (1978) *Photochem. Photobiol.*, **27**, 81~105.

Quail P.H.: (1978) *Photochem. Photobiol.*, **27**, 147~153.

Rüdiger W.: (1980) *Structure and Bonding*, **41**, 101~141.

Sarkar H.K., and Song P.S.: (1981a) *Biochemistry*, (in press).

Sarkar H.K., and Song P.S.: (1981b) Abstract of Bischofsmais Symposium on Light-Mediated Plant Development, Aril, 1981.

Sarkar H.K., and Song P.S.: (1981c) *Photochem. Photobiol.*, (in press).

Sarkar H.K., and Song P.S.: (1981d) *Plant Physiol.*, (submitted for publication).

Sarkar H.K., and Song P.S.: (1981e) *Biochemistry*, **20**, 4315~4320.

Satter R., and Galston A.: (1977) "The Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments," (Ed. by T. Goodwin), pp. 681~735.

Smith, W.O. Jr.: (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 29, 7~2980.

Song P.S.: (1980a) "Molecular Aspects of Photoreceptor Function: Phytochrome," in *Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organisms* (Ed. by F. Lenci and G. Colombetti) Plenum Press, New York, pp. 235~240.

P.S. Song (1980b) Proc. Intl. Congress on Photobiology, Strasbourg, July 21~26, 1980, Abstract No. 100.

Song P.S., and Chae Q.: (1979) *Photochem. Photobiol.*, **30**, 117~123.

Song P.S., and Chae Q.: (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 479~495.

Song P.S., and Kurtin W.E.: (1969) *J. Am. Chem.* Soc., **91**, 4892~4906.

Song P.S., Sarkar H.K., Kim I.S., and Poff K.L.: (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **635**, 369~382.