

人蔘 틸라코이드에서 광계II의 LHCP 인산화와 형광 Quenching

양덕조 · 김명원* · 이성종 · 윤길영

충북대학교 자연과학대학 생물학과

*연세대학교 이과대학 생물학과

(1992년 8월 20일 접수)

LHCP Phosphorylation and Chlorophyll-Fluorescence Quenching of PSII in Ginseng Thylakoid Membrane

Deok-Cho Yang, Myong-Won Kim*, Sung-Jong Lee and Kil-Young Yun

Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University,
Cheongju 360-763, Korea

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea

(Received August 20, 1992)

Abstract □ Using the phosphorylated thylakoid membrane induced by 5~35 kLux of light intensities, we investigated the chlorophyll fluorescence quenching of PSII and the phosphorylation of LHCP II in relation to the chlorophyll-bleaching of *Panax ginseng* C.A. Meyer. In the presence of DCMU, both of the fluorescence yield of non-phosphorylated thylakoid and the rate of fluorescence quenching dependent on the phosphorylation were high *P. ginseng* more than *Glycine max* L. And at the high light intensity (above 25 kLux) the fluorescence quenching rate of *P. ginseng* compared with that of *G. max* reached nearly to 2 times. The LHCP II of *P. ginseng* was composed of 3 major polypeptides (24.5, 26 and 27 kD) and 3 minor polypeptides (24, 25.3 and 28.3 kD) in the region of 24~29 kD and differed from *G. max* in both of the number and quantity of polypeptides. Among these polypeptides, the phosphorylated polypeptide dependent on the light intensity was 24 kD in *P. ginseng*.

Key words □ LHCP phosphorylation, fluorescence quenching, thylakoid membrane, *Panax ginseng*

서 론

틸라코이드 엽록소의 약 50%를 차지하고 있는 광수확 색소-단백질 복합체(light harvesting chlorophyll-protein complex : LHCP)는 광합성계에서 reaction center(RC)로 광에너지를 전달하는 antenna complex로 작용한다.¹⁻³⁾ 이러한 LHCP중에서 대부분을 차지하고 있는 것이 LHCP II(photosystem II의 major LHCP)이며,⁴⁾ 이들 단백질은 핵에 encode되어 있어 cytosol에서 합성되어 엽록체에 이동된다.⁵⁾ LHCP II

는 하나의 major complex인 LHCP II b와 세 종류의 minor complex인 LHCP II a, c, d로 구성되어 있으며, 24~28 kD 범위의 색소-단백질 복합체가 잠재적인 이동성 주변 안테나로써 작용한다.⁶⁻⁸⁾ 색소-단백질 복합체의 이동성은 틸라코이드막에 결합되어 있는 protein kinase/phosphatase에 의해서 LHCP II 단백질이 인산화/탈인산화(state I, II transition)됨으로써 조절되는 것으로 알려져 있으며^{9,10)} 식물체가 강광에 노출되면 LHCP II가 인산화되어 PS II의 RC로 전달되는 광에너지를 감소시킨다.¹¹⁾ 이와같은 LHCP II의 인산화/탈인산화 기작에 관한 연구는 주로 엽록소에 의한 형광 quenching과 autoradiography 방법

本 研究는 1990年度 教育部 基礎科學育成 研究費 支援에 依한 것임(BSRI-90-416)

으로 연구되어 왔는데, 광합성계에서 형광측정은 식물체의 광합성율과 틸라코이드의 구조/조성에 대한 정보를 제공해줌으로써 광합성 수행양상이나 외부환경 스트레스에 따른 영향을 관찰할 수 있는 유용한 indicator로 이용된다.^{14,15)}

인삼의 엽소현상(leaf-burning disease)은 인삼엽에 도달하는 광량이 증가함에 따라 나타나는 색소의 표백화(bleaching) 현상으로써,¹⁶⁻¹⁹⁾ 광 수확과 광에너지 전달 및 분배에 관여하는 엽록체의 LHCP와 매우 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되어 전보²⁰⁾에서 인삼 LHCP의 특성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 전보에 이어서 인삼 LHCP의 광량증가에 따른 인산화 정도를 autoradiography 방법으로 확인하고, 틸라코이드에서 LHCP의 인산화에 따른 photosystem II의 형광 quenching 실험을 병행하여 인삼엽소현상과 photosystem II의 LHCP의 광에너지 분배기작과의 관계를 구명코져 수행하였다.

재료 및 방법

1. 틸라코이드 분리

엽조직을 잘게 자른 후 0.4 M sorbitol, 10 mM NaCl이 함유되어 있는 15 mM tricine buffer(pH 7.8)로 마쇄하여 8점의 거스로 여과하였다. 여과액을 500 g에서 3분간 원심분리하고, 상등액을 다시 5000g에서 5분간 원심분리하여 침전물을 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂가 함유되어 있는 10 mM tricine buffer(pH 7.8)로 현탁하여 형광측정 및 autoradiography 실험에 사용하였다.

2. 틸라코이드 인산화

틸라코이드 단백질의 인산화는 Moll 등²¹⁾의 방법에 준하여 수행하였다. 분리한 틸라코이드 시료에 20 μ Ci (γ -³²P)ATP와 200 μ M ATP를 첨가하여 200 μ g chl/ml로 맞춘 다음, 2 ml 시료를 vial sample 병에 담아 25~27 °C 온도범위에서 metal halide lamp(250 W, General Electric, USA)를 이용하여 광량별로 15분간 노출시켰다. 광처리후 곧바로 NaF(최종농도 10 mM)를 첨가하고 암상태에서 15분간 방치한 다음 광량별로 인산화된 시료로 사용하였다. 대조구는 NaF를 첨가하기 전에 30분간 암상태로 처리하여 NaF를 첨가하고 인산화되지 않은 시료로 사용하였다. 각각의 틸라코이드 시료를 Laemmli²²⁾의 sample buffer로 90 °C에서

2분간 막단백질을 용해한 후 원심분리하였다. 원심분리한 상등액을 12% acrylamide gel로 전기영동하여 건조된 gel을 autoradiography 하였으며, densitometer(LKB 2202)로 각 밴드의 intensity를 측정하였다.

3. 틸라코이드 형광측정

Isotope만이 제거된 상태에서 틸라코이드 인산화 실험과 동일하게 수행하여 광량별로 인산화 및 인산화되지 않은 시료로 사용하였으며, 형광측정은 Kyle 등²³⁾의 방법에 준하여 수행하였다. 형광측정은 5 μ M dichloromethylurea가 함유되어 있는 10 mM tricine buffer(pH 7.8)를 사용하여 틸라코이드 시료를 10 μ g chl/ml로 맞춘 다음, excitation wavelength 440 nm, emission wavelength 684 nm, bandpass 20 nm에서 fluorescence spectrophotometer(Hitachi F-3000)로 측정하였다.

결과 및 고찰

인삼 틸라코이드에서 LHCP II의 인산화에 따른 광에너지 분배능력을 조사하기 위하여 15 kLux의 광 상태에서 인산화를 유도한 시료와 인산화되지 않은 시료의 형광을 측정하여 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 인삼의 광합성계는 LHCP II가 인산화됨에 따라 PS II의 형광이 30% 정도 감소하였으며, 대조구인 콩과

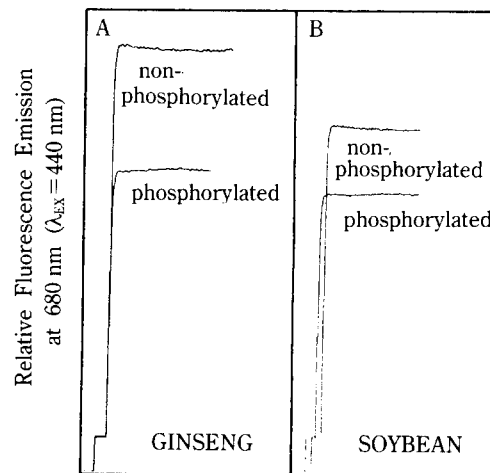


Fig. 1. Fluorescence induction in the presence of DCMU of phosphorylated and non-phosphorylated thylakoid membrane of *Panax ginseng* (A) and *Glycine max* (B).

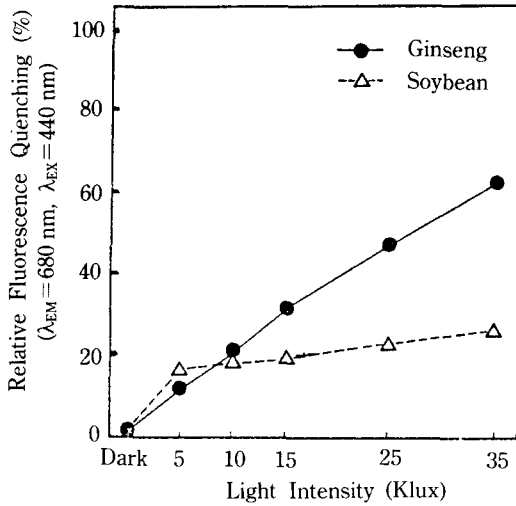


Fig. 2. Fluorescence quenching in the presence of DCMU of phosphorylated thylakoid membranes dependant on the light intensity.

비교해 보면 인삼은 PS II의 형광발생양도 많고 인산화에 의한 quenching율도 현저히 높다는 사실을 확인하였다. 이 결과는 인삼의 이동성 LHCP II가 상대적으로 많다는 사실을 나타내고 있으며, 음식물의 특징인 높은 PS II/PS I ratio와 관련되어 있을 것으로 생각되고 적당한 광조건에서는 PS II/PS I 사이에서 광에너지 분배를 효율적으로 기능을 수행하고 있음을 제시해 주고 있다.

인삼 티라코이드에서 LHCP II의 인산화가 유도되는 광량과 최대 광에너지 분배 능력을 확인하기 위해서 광량을 증가시키면서 LHCP II의 인산화를 유도하여 PS II의 형광발생율을 조사하였다(Fig. 2). 대조식물인 콩의 경우는 5 kLux에서 인산화를 유도하였을 때 16% 정도 형광이 감소하였으며, 광량이 30 kLux까지 증가함에 따라 형광 quenching율이 다소 증가하여 최대 형광 quenching율은 23%를 나타내었다. 반면에, 인삼에서는 5 kLux부터 20 kLux까지 형광 quenching율이 급격히 증가하여 인산화에 따른 최대 형광 quenching율이 60%까지 이르렀다. 일반적으로 양지식물의 경우 LHCP II의 인산화에 의한 즉, state I/II transition에 의한 형광 quenching율은 최대 25% 정도인 것으로 알려져 있다.^{24,25)} 그러나, 인삼의 경우는 25 kLux 이상의 처리구부터는 티라코이드 현탁액의 aggregation이 관찰되었으며 35 kLux에서는 그

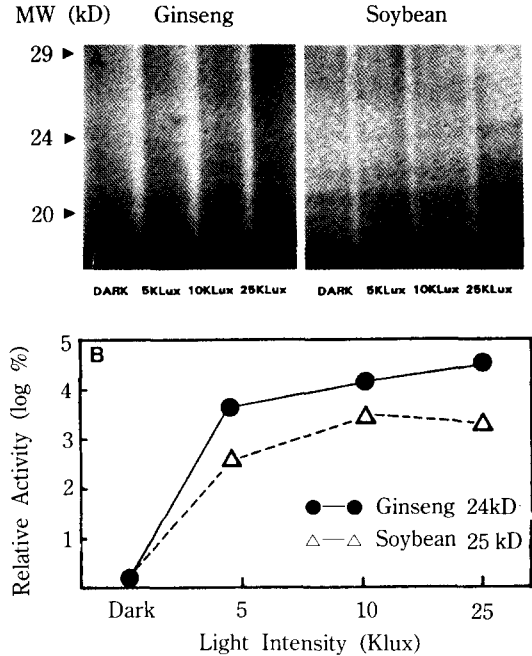


Fig. 3. Effect of light intensity on protein phosphorylation in isolated thylakoid of *P. ginseng* and *G. max*. The gel of Fig. 4 was autoradiographed.

정도가 더욱 심하였다. 이러한 결과는 인삼이 동일한 엽록소 농도에서 이동성 LHCP II가 양적으로 많다는 사실을 제시해주고 있으나, 25 kLux 이상의 광량에서는 인삼 광합성 기구가 구조적으로 변화되어 나타나는 형광감소(quenching율 증가)의 가능성을 배제할 수 없으며, 또한 음식물의 특징인 높은 PS II/I ratio가 quenching율을 증가시키는 요인으로 생각된다.

광량이 증가함에 따라 인산화가 종속적으로 증가하는 LHCP의 구성 단백질은 인삼과 콩이 각각 24 kD, 25 kD였으며(Fig. 3(a)), 각 단백질 밴드의 인산화 증가는 Fig. 3(b)에서 나타난 바와같이 인산화에 따른 형광 quenching 결과와 유사하였다.

이와같이 인삼과 콩의 PS II의 형광 quenching 양상과 인산화의 차이는 광합성계에서 광수확 및 광에너지 분배를 담당하고 있는 LHCP II 구성 단백질의 양적인 또는 질적인 차이에서 기인할 것으로 생각되어 인삼과 콩의 LHCP 단백질 조성을 SDS-PAGE로 조사하였다. 티라코이드에서 PS II의 LHCP 단백질이 포함되어 있는 24~29 kD 범위에서는 단백질의 종류와 수에 있어서 인삼은 콩과 차이를 나타내고 있는데 (Fig. 4), 인삼은 24 kD, 26 kD, 27 kD의 major 밴드와

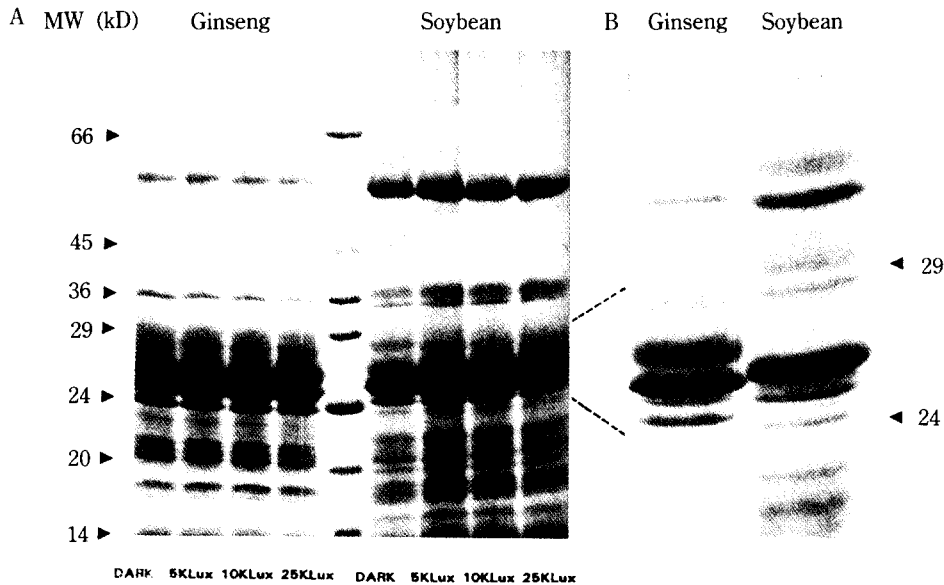


Fig. 4. Polypeptide profiles of thylakoid membrane by polyacrylamide (12%) gel electrophoresis (A) and 24~29 kD LHCP II polypeptide (B).

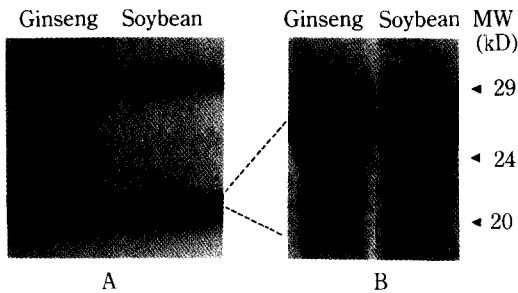


Fig. 5. Unstained, mild denaturing polyacrylamide gel (8%) showing the chlorophyll-protein complex of octylglucoside/SDS (chl : octylglucoside : SDS=1 : 30 : 2) solubilized thylakoid (A). Coomassie brilliant blue-stained 12% Laemmli gel showing the polypeptide composition of isolated LHCP complex (B).

24.5 kD, 25.3 kD, 28.3 kD의 minor 밴드로 구성되어 있으며, 콩은 25.5 kD의 major 밴드와 24 kD, 25 kD, 28.3 kD의 minor 밴드로 구성되어 있었다. 특히, Fig. 5에서와 같이 엽록소-단백질 복합체의 단백질 조성에서도 24~29 kD 범위의 단백질 밴드 intensity가 콩에 비해 인삼에서 현저히 높게 나타났다.

그러므로, 인삼은 낮은 광량의 생육조건에서는 광량 변화에 따라 이동성 LHCP II가 효과적으로 광에너지를 분배하여 효율적으로 광합성을 수행하고 있으나,

강광하에서는 상대적으로 많은 양의 LHCP II가 인산화를 통한 광에너지 분배, 조절능력 범위를 초과하는 광에너지를 흡수하게 됨으로써 광억제(photoinhibition)가 유발되고, 이어서 인삼의 엽소 현상이 시작하는 것으로 생각된다.

요 약

인삼의 엽소현상과 광계 II(photosystem II)의 광수확 엽록소-단백질 복합체(LHCP II)의 광에너지 분배 기작과의 관계를 구명코자 LHCP II의 인산화에 따른 형광 quenching과 광량별 인산화 정도, 그리고 단백질 조성을 조사하였다. 인삼은 DCMU의 존재하에서 photosystem II의 형광발생량이 양지식물인 콩에 비해 많았으며, 인산화에 따른 형광 quenching율도 현저히 높았다. 또한, 강광(25 kLux 이상)에서 인삼은 인산화에 따른 형광 quenching율이 콩에 비해서 2배 정도 높다는 사실을 확인하였다. 엽록소-단백질 복합체(CP-complex)의 조성비율 및 LHCP II를 구성하고 있는 단백질의 양과 수적인 면에서 비교식물과 큰 차이를 나타내었는데, 24~29 kD 범위에서 인삼은 25, 26, 27 kD의 major 밴드와 24, 25.3, 28.3 kD의 minor 밴드로 구성되어 있었으며 광량에 의존적으로 인산

화가 증가하는 인삼의 LHCP II 단백질은 24 kD 이었다.

인용문헌

1. Green, B.R. and Camm, E.L.: *Biochim Biophys Acta*, **67**, 1061 (1982).
2. Thornber, J.P.: *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, Springer-Verlag, p. 98 (1986).
3. Camm, E.L. and Green, B.R.: *Plant Physiol.*, **67**, 1061 (1981).
4. Thornber, J.P.: *Ann Rev Plant Physiol.*, **26**, 127 (1975).
5. Schimdt, G.W., Bartlett, S.G., Grossman, Cashmore, A.R. and Chua, N.K.: *J. Cell. Biol.*, **91**, 468 (1982).
6. Chitinis, P.R. and Thornber, J.P.: *Photosynt Res.*, **16**, 41 (1988).
7. Mullet, J.E.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 9941 (1983).
8. Williams, R.S., Shaw, E.K., Sieburth, L.E. and Bennet, J.: *Method in Enzymology*, **118**, 338 (1986).
9. Allen, J.F., Bennet, J., Steinback, K.E. and Arntzen, C.J.: *Nature*, **291**, 25 (1982).
10. Shochat, S., Owens, G.C., Hubert, P. and Ohad, I.: *Biochim. Biophys. Acta*, **681**, 21 (1982).
11. Steahelin, L.A. and Arntzen, C.J.: *J. Cell. Biol.*, **97**, 1327 (1983).
12. Horton, P. and Black, M.T.: *Biochim Biophys Acta*, **680**, 22 (1982).
13. Telfer, A., Allen, J.F., Baber, J. and Bennetta, J.: *Biochim Biophys Acta*, **722**, 176 (1983).
14. Baker, N.R. and Horton, P.: *Photoinhibition*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 145 (1987).
15. Bjorkman, O.: *Photoinhibition*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, p. 123 (1987).
16. Yang, D.C., Kim, M.W., Choi, J.D. and Lee, S.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(1), 92 (1989).
17. Yang, D.C., Kim, M.W., Chae, Q., Kim, M.S.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(1), 98 (1989).
18. Yang, D.C., Chae, Q., Lee, S.J., Kim, Y.H., Kang, Y.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**(1), 57 (1990).
19. Yang, D.C.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**(2), 135 (1990).
20. Yang, D.C., Lee, S.T., Lee, S.J., Kim, Y.H., Kang, Y.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(2), 158 (1989).
21. Yang, D.C., Lee, S.T., Lee, S.J., Kim, Y.H., Kang, Y.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(2), 158 (1989).
22. Moll, B.A., Eilmann, M. and Steinback, K.E.: *Plant Physiol.*, **83**, 428 (1987).
23. Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970).
24. Kyle, D.J., Haworth, P. and Arntzen, C.J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **680**, 336 (1982).
25. Bennet, J.: *Plant Physiol*, **60**, 583 (1987).
26. Bennet, J.: *FEBS Lett*, **210**, 22 (1987).