

배추 葉綠體의 光系II 活性에 미치는 구리이온의 影響

朴仁虎

(東亞大學校 自然科學 生物學科)

Effect of Cupric Ion on the PS II Activity in Isolated Chinese Cabbage Chloroplasts

Park, In Ho

(Department of Biology, Dong-A University, Pusan)

ABSTRACT

Copper inhibited PS II-mediated O_2 evolution ($H_2O \rightarrow DCIP$, $H_2O \rightarrow SiMo$) but not PSI-mediated O_2 uptake ($DCIP$, $Asc. \rightarrow MV$) in isolated Chinese cabbage chloroplasts. Copper toxicity on PS II-mediated O_2 evolution was higher at alkaline condition than at acidic condition and was enhanced by light illumination after copper treatment. The increased toxicity by light illumination was not recovered by subsequent dark treatment. The inhibitory effect of copper on $H_2O \rightarrow DCIP$ reaction was higher than that on $H_2O \rightarrow SiMo$ reaction. This result suggests that there may be another inhibitory site of copper on PS II other than water oxidizing side of PS II.

緒 論

구리는 배의 黑班病, 꿀의 케역병, 사과와 반점낙엽병, 딸기나 장미의 白粉病 등에 대한 殺菌제로써 $CuSO_4$, copper-8-quinolinolate, 혹은 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone, Bis(ethylenediamine) bis(dodecylbenzenesulfonate) 등과의 화합물 형태로 많이 사용되고 있어서 토양 및 수질오염원으로 대두되고 있다(Suzuki, 1976). 구리는 식물체내의 Plastocyanin과 일부 효소들의 필수성분이기도하며(Katoh *et al.*, 1962) 부족시 열록소감소에 의한 黃白化現象이 유발되기도하지만(Mengel and Kirkby, 1987) 과량이 존재할 경우 조류와 고등식물의 광합성과 성장을 저해하는 것으로 알려져왔다. 구리는 光磷酸化過程과 電子傳達系를 저해하며(Cedeno-Maldonado *et al.*, 1972; Samuelsson and Öquist, 1980; Shioi *et al.*, 1987a; 1978b; Uribe and Stark, 1982) 葉綠素磷光을 저해하는데(Homann, 1969; Park and Kwon, 1986; Shioi *et al.*, 1978b; Vierke and Struckmeier, 1977) 구리의 저해부위와 저해기작에 대해서는 많이 알려져있지않다. Vierke Struckmeier(1977)은 Cu^{2+} 가 thylakoid의 구조적인 변화를 일으켜 전자전달을 저해할 수 있다고 하였으며, 이러한 Cu^{2+} 의 阻沮作用은 Cu^{2+} 처리 후 光照射를 병행할 경우 증진되며(Cedeno-Maldonado *et al.*, 1972) Cu^{2+} 는 光系의 電子傳達活性 뿐 아니라 색소단백질복합체를 파괴하고(Samuelsson and Öquist, 1980) 脂質의 過酸化를

유발할 수 있으며(Sandman and Böger, 1980) 이에 의해 식물의 생장과 광합성의 저해가 나타날 수 있다고 하였다. Shioi等(1978 a;b)은 Cu^{2+} 의 光系II에 대한 저해부위는 反應中心과 DPC(Diphenylcarbazide)電子供與部分 사이에 존재하며 光系I에서는 구리가 ferredoxin과 결합함으로써 ferredoxin에서 NADP^+ 로의 電子傳達經路를 단절한다고 제의하였다. 그러나 이제까지의 實驗에서는 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ (2,6-dichlorophenolindophenol)反應에 대한 Cu^{2+} 의 영향을 조사하여 光系II에 대한 Cu^{2+} 의 阻害效果와 阻害部位를 조사하였을 뿐 光系II活性을 나타내는 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ 반응과 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ (Silicomolybdate)반응을 동시에 측정비교한 보고는 없다.

본 실험에서는 분리한 배추葉綠體에서의 電子傳達過程 중 光系II活性의 척도가 되는 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ 反應과 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ 反應에 대한 Cu^{2+} 의 저해효과를 비교하고 Cu^{2+} 에 의한 활성저해율에 대한 光照射 및 pH의 영향을 조사하여 Cu^{2+} 에 의한 저해가 두 반응에서 다르게 나타남을 확인하였다.

材料 및 方法

葉綠體抽出. 屋外에서 재배한 배추 (*Brassica campestris L.cv.* 서울)잎의 염록체를 Kuwabara와 Murata(1982)의 方法을 變形하여 抽出하였다. 배추잎 30~50 gr을 흐르는 물에 세척하고 차게 한 증류수에 한번 헹군 후 잘게 썰어 100 mM Sucrose, 200 mM NaCl을 포함하는 25 mM Tricine-NaOH(pH 7.4)완충용액 90~100 ml와 함께 7~10초간 췌하였다. 이 마쇄액을 16겹의 거즈로 여과한 후 얻어진 현탁액을 3,000 × g에 5분간 원심분리하여 상정액은 버리고 침전물을 다시 같은 완충액에 현탁하여 500 × g에서 1분간 원심분리하여 세포파편을 제거하고 그 상정액을 3,000 × 에서 5분간 원심분리하였다. 이 침전물을 다시 HSN(300 mM Sucrose, 10 mM NaCl, 0.05 % BSA, 50 mM HEPES-NaOH)완충용액(pH 7.6)에 현탁시켜 葉綠素의 최종 농도가 ml當 1.5~2.0 mg되도록 조정하여 이것을 본 실험에서의 分離葉綠體시료로 간주하였다. 위의 全過程은 0~4°C에서 시행하였다.

CuSO_4 處理. 2.5ml의 HSN완충용액에 葉綠素含量이 190 μg 되도록 한 후 일정농도의 CuSO_4 용액을 첨가하여 약 5,000 lux의 형광등빛하에 20분간 방치한 후 즉시 電子傳達系 活性測定에 사용하였다. 光系I, 光系II, 光系I + II反應活性에 대한 Cu^{2+} 의 效果를 비교하는 실험(Table 1)에서는 CuSO_4 와 FeCy(K-ferricyanide)가 같이 있을 경우 靑色の 침전현상이 일어났고, Cu^{2+} 에 의하여 Ascorbate가 酸化될 때 酸素吸收가 일어나므로(Weissberger and Lu valle, 1944)반응용액내의 Cu^{2+} 를 제거하기 위하여 CuSO_4 를 처리하여 형광등하에 20분간 방치한 시료를 원심분리하여 침전시킨 후 200 μM 의 EDTA가 포함되어거나 포함되지 않은 300 mM Sucrose용액으로 다시 현탁하고 원심분리하였다. 이와같은 세척過程을 2번 시행한 후의 침전물을 HSN완충용액에 현탁시켜 電子傳達活性測定의 試料로 사용하였다.

電子傳達活性測定. 分離葉綠體의 電子傳達活性은 Clark型의 O_2 電極(YSI 53 Oxygen monitor, U.S.A.)을 사용하여 酸素發生量 혹은 酸素吸收量으로써 計算하였다. 反應용액은 2.5 ml의 HSN완충용액(pH 7.6)에 190 μg 의 葉綠素量이 포함되어게하였다. 光系I + II 활성은 2.4 mM FeCy 및 uncoupler로써 12 mM NH_4Cl 을 첨가한 후 발생하는 酸素의 양으로 측정하였고 光系II의 활성은 0.2 mM Simo를 첨가하여 발생하는 산소의 양 측정하거나 0.3 mM DCIP를 첨가하여 발생하는 酸素의 양으로 측정하였다. 光系I의 활성은 阻害劑로써 1.24 μM DCMU, 0.1 mM NaN_3 , 電子學容體로써 0.05 mM MV(Methylviologen), 電子供與體로써 0.

3 mM DCIP와 10 mM ascorbate를 첨가하여 흡수되는 酸素의 양으로 측정하였다. 빛의 照度는 tungsten lamp(100V, 300W, Koken Co., Japan)의 빛을 C-4형 靑色필터(Kenko Co., Japan)와 1 cm의 물을 통과시킨 후 약 34,000 lux가 되게 하였으며 25°C에서 측정하였고, 실험은 3時間 以內에 完了하였다.

葉綠素定量. 葉綠素定量은 Arnon(1949)의 방법에 따랐다. 20 μ l의 葉綠體 현탁액은 5 ml의 80 % acetone용액과 혼합하여 여과시킨 후 645 nm와 663 nm에서 그 추출액의 흡광도를 측정하여(Shimadzu UV-240, Japan) 葉綠素含量을 산출하였다.

結果 및 考察

분리한 배추葉綠素에 200 μ M의 CuSO_4 를 첨가하고 20분간 光照射를 한 후 다시 이를 세척하여 電子傳達活性을 조사한 결과 光系 II에서 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ 의 경우는 약 49%, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ 의 경우는 약 57%의 저해를 나타내었으며 光系 I ($\text{DCIP} \cdot \text{Asc} \rightarrow \text{MV}$)의 경우는 약 13% 증가하는 경향을 보였다(Table 1). CuSO_4 처리 후 세척하였음에도 그 沮害效果가 나타나는 것은 Cu^{2+} 가

Table 1. Effect of cupric sulfate on the photosynthetic electron transport activity

Treatment*	O_2 evolution or uptake(μ mol O_2 /mg chl · hr)			
	$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeCy} + \text{NH}_4\text{Cl}$ PS I + II	$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ PS II	$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ PS II	$\text{DCIP} \cdot \text{Asc} \rightarrow \text{MV}$ PS I
None	-EDTA 167.01 \pm 23.18	61.28 \pm 3.46	73.97 \pm 6.22	233.83 \pm 8.04
	+EDTA 173.09 \pm 28.34	69.31 \pm 6.15	72.67 \pm 7.39	272.11 \pm 25.91
200 μ M CuSO_4	-EDTA 81.41 \pm 14.17	30.91 \pm 5.24	31.65 \pm 4.60	264.14 \pm 6.23
	+EDTA 87.10 \pm 17.69	31.94 \pm 6.95	39.20 \pm 3.42	312.22 \pm 10.42

* The chloroplast suspension was illuminated for 20 min under each treatment and then washed twice with 0.3M sucrose solution in the presence or absence of 200 μ M EDTA.

thylakoid에 결합하여(Cedeno-Maldonado *et al.*, 1972;Uribe and Stark, 1982) 나타날 수 있고 광계 I에 대한 CuSO_4 의 Cu^{2+} 效果가 나타나지 않는 것은 MV에 대한 전자공여부위가 광계 I의 최초 電子受容係임으로써 Shioi등(1978 a;b)이 주장한 바와같이 光系 I에 대한 Cu^{2+} 의 沮害部位가 ferredoxin에 있기때문에 $\text{DCIP} \cdot \text{Asc} \rightarrow \text{MV}$ 반응이 영향을 받지 않은 것 같다. Thylakoid에 느슨하게 결합된 Cu^{2+} 을 제거하기 위하여 세척시 EDTA를 첨가한 경우에도 구리이온에 의한 저해의 정도에 큰 변화가 없는 것으로 보아 구리이온이 ferredoxin의 -SH基에 결합하는 것처럼(Friedman, 1973;Orme-Johnson, 1973) 光系 II의 어떤 단백질의 -SH기에 강하게 결합할 가능성(Vierke and Struckmeier, 1977)도 있다고 할 수 있겠다. 이와같은 CuSO_4 의 效果가 구리이온에 기인하는 것인지를 확인하기 위하여 6×10^{-5} 의 CuSO_4 , CuCl_2 , $\text{CuCNO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 처리하여 光系 II에 대한 效果를 조사한 결과 세가지 化合物이 공통적으로 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ 반응을 약 42% 저해하였고 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ 반응을 약 12-15% 저해하였다(未發表자료). 이 경우 세척한 시료에 비하여 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ 반응에 대한 저해가 현저히 감소함을 보였다.

여러가지 농도의 구리이온을 葉綠體에 처리하여 20분동안 光照射한 후 즉시 그 활성을 조사

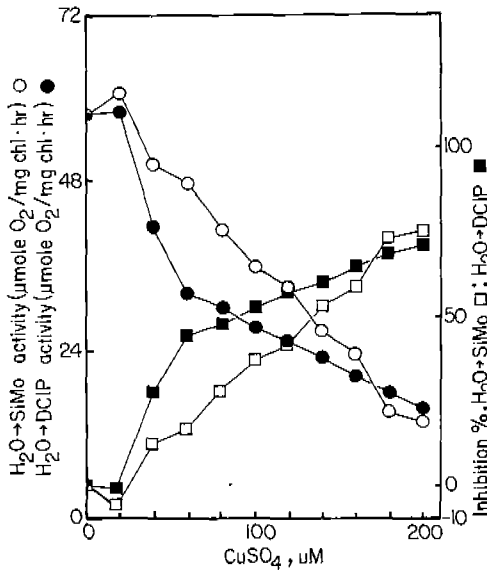


Fig. 1. Inhibitory effect of cupric sulfate on the photosynthetic O₂ evolution at various concentrations. The O₂ evolution was measured after 20 minutes incubation.

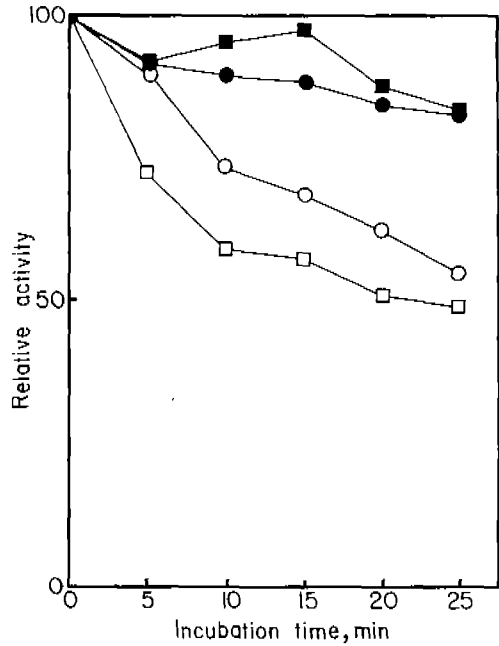


Fig. 2. Time course of photosynthetic O₂ evolution activity during the incubation with 60 μ M cupric sulfate; ●—● (H₂O → SiMo) and ■—■ (H₂O→DCIP), in dark; ○—○ (H₂O → SiMo) and □—□ (H₂O→DCIP), in light at 25 C.

하였을 때, 光系II에 대한 저해幅은 구리이온의 농도증가에 비례하여 점차 증가하였다(Fig. 1). 200 μ M의 CuSO₄를 처리하였을 때 약 75%의 저해를 보였으나 낮은 농도에서는 H₂O→DCIP反應이 H₂O→SiMo反應에 비하여 더 큰 저해를 받음을 볼 수 있었다. 이와같은 두 반응에 대한 저해율의 차이는 Cu²⁺를 처리한 葉綠體를 세척한 후에 측정된 경우에도 비록 차이는 적으나 동일한 경향을 볼 수 있었다(Table 1).

Cu²⁺에 의한 光合成活性의 저해는 Cu²⁺처리 후 光照射를 병행할 경우 증가한다(Cedeno-Maldonado *et al.*, 1972). 본 실험에도 光系II의 活性測定前에 光下 혹은 暗處에서 일정시간 방치한 후 光系II活性에 대한 Cu²⁺의 저해효과를 조사하였다. 그 결과 Cu²⁺처리 후 暗處에서 방치하였을 경우 시간이 지남에 따라 약간씩 저해가 증가되어 25분 후에는 두 반응 공히 약 20% 정도의 저해를 받았으나 光下에 방치하였을 경우 Cu²⁺에 의한 저해효과가 시간이 지남에 따라 크게 증가하여 H₂O→DCIP反應에서는 52% 정도의 저해를 나타내었고 H₂O→SiMo反應에서는 약 45% 정도의 저해를 나타내었다(Fig. 2). Cu²⁺을 葉綠體에 처리하여 光下에 방치함으로써 증진된 저해효과가 이를 다시 暗處에 방치할 경우 저해된 활성이 회복될 수 있는지를 조사하기 위하여 光下 및 暗處에 방치하는 시간을 달리하여 저해율을 조사한 결과 일단 光에 의해 증진된 구리의 저해작용은 시료를 다시 暗處에 방치하더라도 가역적으로 회복되지 않았다(Table 2). 여러가지 pH에서 光系II活性과 이에 대한 구리이온의 저해효과를 조사한 결과 H₂O→

Table 2. Photosynthetic O₂ evolution activity after incubation with cupric aulfate at various light/dark time condition

Conditions		H ₂ O→DCIP	%	H ₂ O→SiMo	%
None	no incubation	52.27*	—	61.78*	—
None	20D/OL**	51.29	100	61.80	100
	20L/OD	47.18	92	58.50	94.62
60uM CuSO ₄	20D/OL	35.65	69.50	58.86	95.20
	20L/OD	20.00	39.00	43.54	70.42
	5L/15D	26.68	52.00	44.58	72.11
	15D/5L	24.05	46.90	44.57	72.10
	10D/10L	21.84	42.60	44.17	76.30
	10L/10D	22.15	43.20	45.60	73.80

* Unit; μmol O₂/mg chl·hr

** L or D means the incubation time(min)under the different light (L) or dark (D) conditions respectively.

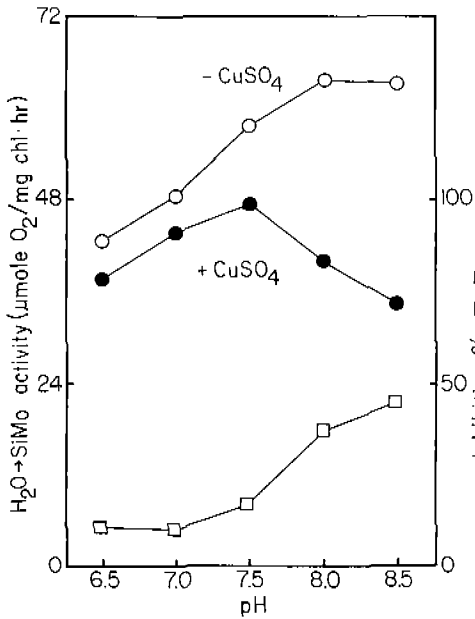


Fig. 3. Effect of cupric sulfate(60 μM) on the photo-synthetic O₂ evolution(H₂O→SiMo) at various pHs.

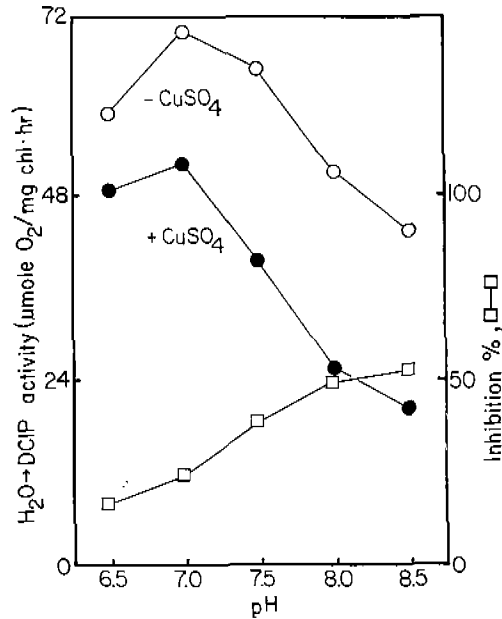


Fig. 4. Effect of cupric sulfate(60 μM) on the photo-synthetic O₂ evolution(H₂O→DCIP) at various pHs.

SiMo反應은 鹽氣性條件에서 높은 활성을 나타내고 있으며 (Fig. 3) H₂O→DCIP反應은 中性條件에서 높은 활성을 나타내는데 (Fig.4) 이러한 각 pH에서 Cu²⁺을 첨가하여 저해정도를 비교하였을때 두 반응이 모두 염기성조건하에서 더 큰 저해를 받았다. Shioi등(1978b)은 葉綠體에서 光系II에 의한 DCIP還元反應이 염기성조건에서 구리이온에 의한 저해를 크게 받았다고 하였

고, Bazzaz와 Govindjee(1974)는 DCIP還元反應에 대한 Pb^{2+} 의 저해작용이 pH 7.8에서는 크게 나타났으나 pH 6.5에서는 저해작용이 나타나지않을 뿐 아니라 고농도의 Pb^{2+} 첨가시 오히려 활성이 증가한다고 보고하였다. Dilley와 Rothstein(1967)은 Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} 등 2價 양이온을 葉綠體에 처리할 경우 酸性條件下에서 나타나는 葉綠體의 수축현상과 같은 효과가 나타난다고 하였고 Murakami와 Packer(1970)는 酸性條件이나 光下에서 thylakoid의 수축이 일어난다고 하였다. Vierke와 Struckmeier(1977)은 Cu^{2+} 가 어떤 基에 결합하고 이로 인하여 thylakoid의 構造的變化가 일어남으로써 電子傳達活性이 저해된다고 보고하였다. 그런데 본 실험의 결과를 보면 Cu^{2+} 에 의한 電子傳達活性阻害가 틸라코이드의 構造的인 變化以外的 어떤 作用에 의해서 나타날 가능성도 있다고 하겠다. 왜냐하면 틸라코이드의 構造的 變化에 對하여 Murakami와 Packer(1970)는 酸性條件과 光下에서 수축이 일어나고 葉기성條件과 暗下에서 팽창이 일어난다고 하였는데, Cu^{2+} 가 이러한 틸라코이드의 수축현상을 일으키고 (Dilley and Rothstein, 1967) 이것이 阻害作用과 關聯된다고 한다면 本實驗에서 틸라코이드의 수축현상이 나타날 수 있는 光下條件과 팽창현상이 나타날 수 있는 葉기성條件에서 Cu^{2+} 의 阻害作用이 크게 나타나는 點을 잘 說明하기 어렵기 때문이다.

또 본 실험에서 光系II 활성을 나타내는 두 반응에 대한 저해율을 비교해 볼때, 모든 조건하에서 $H_2O \rightarrow DCIP$ 반응에 대한 Cu^{2+} 의 저해효과가 $H_2O \rightarrow SiMo$ 反應에 비하여 크게 나타났는데 (Tables 1,2; Figs. 1,2,3,4) 이와같은 결과는 Cu^{2+} 이 이미 제시된 물분해기구쪽의 전자전달 과정을 저해하는 것 외에도 어떤 다른 기작을 통하여 저해효과를 나타낼 가능성을 제시한다고 생각할 수 있겠으나, 현재의 실험만으로는 단정지을 수 없으므로 이에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 사료한다.

摘 要

分離한 배추 葉綠體에 Cu^{2+} 를 處理하였을 때 나타나는 光合成電子傳達系의 活性저해효과를 조사하였다. Cu^{2+} 처리에 의하여 광계 II ($H_2O \rightarrow DCIP$, $H_2O \rightarrow SiMo$)活性이 저해되었고, 광계 I ($DCIP$, $Asc. \rightarrow MV$)活性은 약간 증진되었다. Cu^{2+} 의 전자전달계활성에 대한 저해효과는 光下 및 葉기성조건하에서 크게 나타났으며, 光에 의해 증진된 저해효과는 暗處理에 의하여 회복되지않았다. 광계 II 활성을 나타내는 2 가지 반응중 $H_2O \rightarrow DCIP$ 반응이 $H_2O \rightarrow SiMo$ 반응에 비해 더 큰 저해를 받았다. 이는 Cu^{2+} 가 광계 II의 물 분해기구쪽의 전자전달과정 이외에 어떤 다른 저해 부위를 저해할 가능성을 나타낸다고 할 수 있다.

參 考 文 獻

- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Bazaz, M.B. and Govindjee. 1974. Effects of lead chloride on chloroplast reaction. *Environ. Lett.* **6**: 175-191.
- Cedeno-Maldonado, A., J.A. Swader and R.L. Heath. 1972. The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **50**: 698-701.
- Dilley, R.A. and A. Rothstein. 1967. Chloroplast membrane characteristics. *Biochim. Biophys. Acta.* **135**: 427-443.
- Friedman, M. 1973. *The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides, and proteins.*

- Pergamon Press. Oxford. Cited in Vierke and Struckmeier(1977).
- Homann, P.H. 1969. Cation effects on fluorescence of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **44**: 932-936.
- Kato, S., I. Shiratori and A. Takamiya. 1962. Purification and some properties of spinach plastocyanin. *J. Biochem.* **51**: 32-40.
- Kuwabaa, T. and N. Murata. 1982. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* **23**: 533-539.
- Mengel, K. and E.A. Kirkby. 1978. *Principles of plant nutrition*. International Potash. Institute. Bern. Switzerland. pp. 463-474.
- Murakami, S. and L. Packer. 1970. Protonation of chloroplast membrane structure. *J. Cell Biol.* **47**: 332-351.
- Orme-Johnson, W.H. 1973. Ferredoxins and other iron-sulfur proteins. In, *Inorganic Biochemistry* · Eichhorn, G.L.(ed.), **2**: 710-744.
- Park, I.H. and Y.M. Kwon. 1986. Effect of cupric sulfate on the chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts from Chinese cabbage. *Kor.Biochem. J.* **19**: 207-212.
- Samuelsson, G. and G. Öquist. 1980. Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of *Spinacia oleracea*. *Plant & Cell Physiol.* **21**: 445-454.
- Sandman, G. and P. Böger. 1980. Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Z. Pflanzenphysiol.* **98**: 53-59.
- Shioi, Y., H. Tamai and T. Sasa. 1978. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* **19**: 203-209.
- Shioi, Y., H. Tamai and T. Sasa. 1978b. Inhibition of photosystem II in the green alga *Ankistrodesmus falcatus* by copper. *Physiol. Plant.* **44**: 434-438.
- Uribe, E.C. and B. Stark. 1982. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion. *Plant Physiol.* **69**: 1040-1045.
- Vierke, G. and P. Struckmeier. 1977. Binding of copper(II) to proteins of the photosynthetic membrane and its correlation with inhibition of electron transport in class II chloroplasts of spinach. *Z. Naturforsch.* **32**: 605-610.
- Vierke, G. and P. Struckmeier. 1978. Inhibition of millisecond luminescence by copper(II) in spinach chloroplasts. *Z. Naturforsch.* **33**: 266-270.
- Weissberger, A. and J.E. Lu valle. 1944. The autooxidation of ascorbic acid in the presence of copper. *J. Amer. Chem. Soc.* **66**: 700-705.
- Suzuki, N. 1976. *Physiological mode of action of herbicides and pesticides*, Nanedo Tokgo, Japan (in Japanese), pp. 126-128.

(1987. 8. 24 接受)