

人蔘 Light Harvesting Chlorophyll Protein의 특성 및 葉燒病에서 Singlet Oxygen(1O_2) Quenching

양덕조·이성택*·이성종·김용해·강영희**

충북대학교 자연과학대학 생물학과

*한국과학기술대학

**연세대학교 이과대학 생물학과

(1989년 10월 12일 접수)

Characteristics of Light Harvesting Chlorophyll-Protein Complex and Singlet Oxygen (1O_2) Quenching in Leaf-burning Disease from *Panax ginseng* C. A. Meyer

Deok-Cho Yang, Sung-Taick Lee*, Sung-Jong Lee, Yong-Hae Kim and Young-Hee Kang**

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

*Korea Institute of Technology, Daejeon and

**Department of Biology Yonsei University, Seoul, Korea

(Received October 12, 1989)

Abstract □ In order to determine the relationships between the leaf-burning disease and the light harvesting chlorophyll-protein (LHCP) complex in *Panax ginseng* C. A. Meyer, we investigated the chlorophyll-protein (CP) complex of the thylakoid membrane and its characteristics. In *P. ginseng*, four CP-complex bands determined by non-denaturing SDS-PAGE were identified CP I* (containing reaction center of photosystem I and LHCP I antennae), CP I (reaction center of photosystem I), LHCP II** (oligoform of LHCP II), and LHCP II (photosystem II antennae; CP 26 and CP 29) by Bassi's and Dunahay's procedures. Under our experimental condition, the CP I band was only observed in *P. ginseng* and the band intensity of LHCP II** in *P. ginseng* was higher than in spinach and soybean. There were differences in the absorption and fluorescence spectra and chlorophyll a/b ratio of the CP-complex bands between *P. ginseng* and other plants. The polypeptide content of *P. ginseng* thylakoid was lower than in spinach and soybean thylakoid, and the polypeptide profiles of *P. ginseng* was low band intensity, especially about 29-35 kD, 55 kD, and 60 kD, compared to spinach and soybean. The inhibitory effects of 2,5-dimethylfuran, specific singlet oxygen (1O_2) quencher, showed that singlet oxygen destroyed 60% of chl.a, 90% of chl.b and 70% of carotenoid in bleaching *P. ginseng* with leaf-burning disease.

Keywords □ *Panax ginseng* C. A. Meyer, light harvesting chlorophyll protein, chlorophyll protein, leaf-burning disease, photobleaching.

서 론

植物 光合成에서 집광성 엽록소-단백질 복합체 (light-harvesting chlorophyll-protein complex; LHCP)는 광에너지의 효율적인 이용을 위하

本 研究는 1989년도 文敎部 基礎科學育成 研究費 支援에 依한 것임.

여 photosystem(PS)과 연계되어 있으며, 또한 과다한 光에너지가 照射되면 PS II로의 energy transfer를 억제하여 chlorophyll을 비롯한 pigments 및 macromolecule의 photooxidation을 보호해 주는 중요한 생리적 역할을 하고 있다.¹⁻³⁾ 이러한 energy 분배 조절기작은 protein kinase가 LHCP를 인산화(phosphorylation) 또는

탈인산화(dephosphorylation) 시킴으로써 이루어 지는데, protein kinase는 强光하에서 plastoquinon(PQ) pool의 reduced-PQ가 축적되면 LHCP를 인산화시켜 PS II로의 energy transfer를 억제하여 O₂ evolution 및 excess solar energy에 의한 photodynamic reaction을 방지하고 있다.⁴⁻⁷⁾

人蔘葉燒病에 대하여 梁 등^{8,9)}은 과다한 赤色 光에 의한 photooxidation이라고 보고하였으며, 人蔘葉燒病 진행과정에서 光酸化작용의 억제 酵素인 superoxide dismutase catalase, peroxidase의 inactivation에 의해 光酸化작용이 촉진되고^{10,11)} pigments의 光酸化작용을 일으키는 주요 active oxygen species는 singlet oxygen(¹O₂)임을 제시한 바 있다.¹²⁾ 따라서 본 연구실에서는 人蔘葉燒病에서 ¹O₂가 다량 생산되는 원인을 人蔘엽록체에 존재하는 LHCP의 energy 배분능력이 결여되어 있거나 또는 LHCP로부터 과도하게 전달된 energy를 전자전달계(electron transport system)가 효율적으로 수용하지 못하기 때문에 PS II에서 과다한 光에너지에 의해 생산되는 O₂가 excess solar energy에 의해 ¹O₂으로 전환되어 人蔘葉燒病이 유발된다는 가정하에 연구를 진행하고 있다.

본 연구는 人蔘葉燒病과 LHCP의 관계를 구명하기 위한 기초연구로서 人蔘의 chlorophyll-protein(CP) complex의 조성을 C₃-식물인 spinach와 soybean과 비교하여 조사하였고, 각 CP-complex의 pigment composition, absorption spectra 및 fluorescence spectra를 측정코져 하였다. 또한 人蔘의 thylakoid protein pattern과 specific ¹O₂ quencher를 사용하여, 이제까지 보고된 바 없는 人蔘 CP-complex의 조성 및 특징과 人蔘葉燒病에 관한 기초자료를 획득하였기에 보고한 바 있다.

재료 및 방법

1. 供試試料

본 실험에 사용한 高麗人蔘(*P. ginseng* C. A. Meyer)은 한국인삼연구소에서 분양받은 苗蔘(생체 중: 1.5g)을 광량 및 온도가 조절되는

growth chamber(30°C, 20 KLux)와 일반 관행법¹³⁾에 준하여 재배하였다. 그리고 시금치(*Spina-cia oleracea* L.)와 콩(*Glycine max*)은 야외에서 재배한 것을 이용하였다.

2. Thylakoid membrane 분리

試料 10g fw.을 Sun¹⁴⁾와 Camm, Green¹⁵⁾의 방법에 준하여 thylakoid membrane을 분리하였다. 채취된 잎을 직경 2mm로 자른 뒤 cold buffer[25 mM Tricine(pH 7.6), 0.4 M sucrose, 1 mM NaCl]으로 마쇄한 후 8겹의 gauze로 여과, 원심분리하여 intact chloroplast을 얻었다. Chloroplast을 lysis하기 위하여 low osmotic solution [25 mM Tricine(pH 7.6), 1 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 0.1% BSA]로 lysis한 후 12,000×g에서 원심분리하였다. Pellet을 같은 buffer로 재현탁하여 thylakoid membrane suspension을 얻는다. 본 실험에 사용된 모든 buffer는 proteinase inhibitors(3 mM ρ -aminobenzamide, 1 mM phenylmethylfonylfluorid, 4 mM ϵ -aminocaproic acid)가 함유되어 있다.

3. Chlorophyll-protein complexes의 분리

Chlorophyll-protein complexes의 분리는 Dunahay와 Staehelin,¹⁶⁾ Burke¹⁷⁾의 방법에 따라 수행하였다. Thylakoid membrane을 solubilization 전에 2 mM Tris-maleate buffer(pH 7.0)으로 세척한 뒤 5% Triton X-100 또는 0.88% (w/v) octyl-glucoside가 함유된 2 mM Tris-maleate buffer(pH 7.0)로 현탁한 후 ice에서 30분간 incubation 시킨 다음 starch와 debris를 제거하기 위하여 10,000×g에서 15분간 원심분리하였다.

Chlorophyll protein(CP)-complexes의 전기영동은 Bassi 등¹⁸⁾의 방법에 준하여 수행하였다. CP-complex의 분리는 7-15% linear acrylamide gradient를 사용하여 분리하였고 Protein의 분리는 10-15% linear acrylamide gradient를 사용하였다. Gels의 고정용액은 10% TCA가 첨가된 methanol: water: acetic acid[5: 5: 1]로 고정하고 coomassie brilliant blue R250으로 염색하였다.

4. Spectroscopy

Chlorophyll protein complexes의 absorbance와 fluorescence 측정을 위해서 CP-complex의 전기영동 후 green band를 pool로 만든 다음 D.W.를 첨가하여 ice에서 4시간 정도 방치한다. Acrylamide debris를 제거하기 위하여 1,000×g에서 5분간 원심분리하였다. Fluorescence emission spectra는 spectrofluorometer[Hitachi F-3000]을 사용하였고 absorption spectra은 spectrophotometer[Hitachi U-3400]을 이용하였다. Chlorophyll 함량은 Arnon¹⁹⁾의 방법에 따라 수행하였고, 단백질 함량은 Lowry²⁰⁾의 방법으로 측정하였다.

5. Chlorophyll의 photooxidation에서 2,5-Dimethylfuran의 영향

人蔘의 thylakoid membrane에서 2,5-Dimethylfuran[2,5-DMF]의 영향은 thylakoid membrane suspension에 2,5-DMF 0, 5, 1, 0, 2, 0, 4, 0, 8, 0, 10 mM로 처리한 후, 2만 Lux 광량하에서 3시간 동안 처리하여 chlorophyll과 carotenoid 함량 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

人蔘의 chlorophyll protein complex(CP complex)는 4개의 band로 분리되었으며, 각각은 Bassi,¹⁸⁾ Dunahay¹⁶⁾의 방법에 따라 CP I*, CP I, LHCP II**, LHCP II로 동정하였다. CP I*는 PSI reaction center인 CPI과 LHCP I antennae로 구성되어 있으며, spinach와 soybean과 비교해 볼 때 유사한 band intensity를 나타내었다. CP I band는 본 실험조건에서 人蔘에서만 분리되었으며, 이것은 人蔘 PSI의 reaction center인 CPI의 polypeptide composition이 비교식물과 차이가 있음을 제시하고 있다. 同量の 供試試料를 사용한 본 실험에서 LHCP II의 oligoform인 LHCP II**는 陽地植物인 spinach나 soybean에 비해 人蔘의 band intensity가 현저히 높게 나타났으며, PS II antennae인 CP 29나 CP 26으로 구성되어 있는 LHCP II는 비교식물과 유사한 band intensity를 나타내었다(Fig. 1). 이러한 결과는 PS II로 solar energy를 transfer하는 PS II의

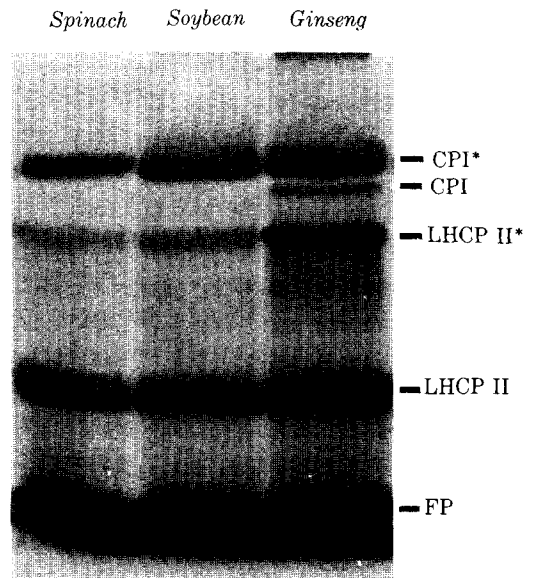


Fig. 1. Unstained gels after non-denaturing SDS-PAGE on the 7-15% polyacrylamide gels. Showing the chlorophyll-protein complexes of *ginseng*, *spinach*, and *soybean* thylakoid membrane. CP I* contains the PSI reaction center (CP I), LHCP I antennae, LHCP II** is the major light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes of PS II, LHCP II contains the CP 29 (PS II antennae), CP 26 (new PS II antennae), FP (free pigment). The nomenclature is that of Bassi and co-workers¹⁸⁾ with Dunahay and co-workers¹⁶⁾.

light-harvesting CP complex가量적인 면에서 오히려 陽地植物보다 더 많이 존재하고 있음을 보여주고 있다. 따라서 人蔘葉燒病의 chlorophyll bleaching 현상은 PS II light harvesting CP-complex의 energy transfer 능력에 관련된 phosphorylation이나 전자전달능과 밀접한 연관성이 있을 것으로 추측할 수 있다.

人蔘에서 CP I*, LHCP II** 및 LHCP II bands의 absorption spectra는 각 bands의 chl, a, b 및 accessory pigments의 composition이 陽地植物과 차이가 있고, CP-complexes의 band별 조성비율 역시 차이가 있음을 보여주고 있다(Fig. 2).

人蔘 CP-complexes의 fluorescence spectra에서도 fluorescence maximum과 intensity에서

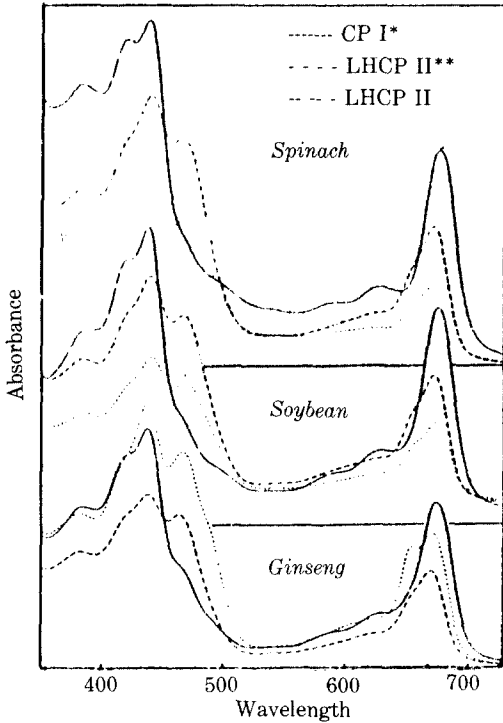


Fig. 2. Absorption spectra of chlorophyll-protein complex bands (CP I* LHCP II**, LHCP II) at room temperature. Triton X-100 was used as detergent.

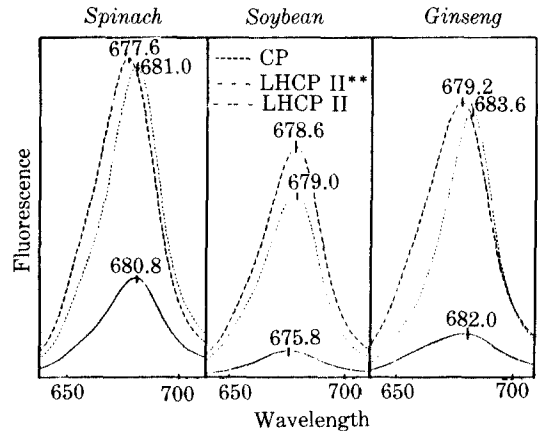


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of chlorophyll-protein complexes at room temperature. CP I*, LHCP II**, LHCP II were excited at 438 nm.

비교식물과 차이가 있고, 3가지 band-공히 fluorescence maximum이 1~3nm 정도 장파장인 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이러한 fluorescence maximum의 차이는 人蔘 특유의 pigment composition 및 色素가 결합한 polypeptide의 composition 또는 conformation에 의한 것으로 사료된다.

人蔘 CP-complex의 band별 특성을 종합하여 보면 Table 1과 같다. 人蔘의 CP I*과 LHCP II는 chl. a : b ratio가 각각 5, 226, 1, 189로써 비교식물보다 chl. b의 비율이 다소 높은 반면, LHCP II**는 1.459로써 spinach(1.022) 및 soybean(11.205)에 비해 chl. a의 비율이 높은 것으로 확인되었다. CP-complex band별 absorption peak은 CP I*이 673.3과 436.2 nm 이고, LHCP II**는 4개의 peaks(670.1, 653.0, 466.2, 437 nm)이 그리고 LHCP II는 3개의 peaks(668.8, 463.0, 437.4 nm)이 존재하였으며, fluorescence maximum은 CP I*이 682.0 nm, LHCP II**는 683.6 nm 또한 LHCP II는 679.8 nm로 나타났다.

Table 2는 thylakoid membrane의 polypeptide 함량 및 chl./carotenoid 비율을 조사한 결

Table 1. Characteristics of the chlorophyll a/b-protein complexes of thylakoid membrane

	Chlorophyll a/b ratio	Absorption peak (nm)			Fluorescence maximum (nm)		
<i>Ginseng</i>	CP I*	5.226	673.3	436.2	682.0		
	LHCP II*	1.459	670.1	653.0	466.2	437.1	683.6
	LHCP II	1.189	668.8	463.0	437.4	679.8	
<i>Spinach</i>	CP I*	5.376	674.2	436.2	680.8		
	LHCP II**	1.022	670.7	465.0	437.4	681.0	
	LHCP II	1.119	670.7	465.0	437.4	677.6	
<i>Soybean</i>	CP I*	6.125	674.6	437.4	675.0		
	LHCP II**	1.205	670.1	464.6	437.4	679.0	
	LHCP II	1.376	669.8	464.0	438.1	678.6	

Table 2. Protein content, total chl.a/b ratio, and chl./carot. ratio of thylakoid membrane in *ginseng*, *spinach*, and *soybean*. Triton X-100 (5%) was used as membrane detergent.

	Protein content (mg/mg chlorophyll)	Total chloro- phyll a/b ratio	Chl./Caro.
<i>Ginseng</i>	1.40 ± 0.05	2.63	7.74
<i>Spinach</i>	3.00 ± 0.12	3.39	7.52
<i>Soybean</i>	4.63 ± 0.04	3.17	11.96

과로써, 人蔘의 membrane polypeptide 함량이 1.40 ± 0.05 mg protein/mg chl. 인 반면 spinach 는 3.00 ± 0.12 mg, soybean 은 4.63 ± 0.04 mg 으 로 人蔘의 thylakoid membrane polypeptide 함 량이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 이 결과는 전자 전달계의 electron carrier, ATPase, chloro-phyll-bound polypeptide 와 같은 thylakoid 구성 단백질 등이 양적인 면에서 人蔘과 陽地植物 사이에서 현저한 차이가 있음을 잘 제시하여 주고 있다.

Boardman 등²¹⁻²³은 陰地植物의 electron transfort 능력이 양지식물에 비해 PS II 는 약 1/40(DCPIP ; 98 : 1350 μ eq mg. chl⁻¹hr⁻¹), PSI 은 1/6 정도로 현저히 낮은 것으로 보고하였는 바, 人蔘의 경우 전자전달계의 electron carrier 의 부족으로 인하여 비교적 낮은 光量하에서도 전자전달

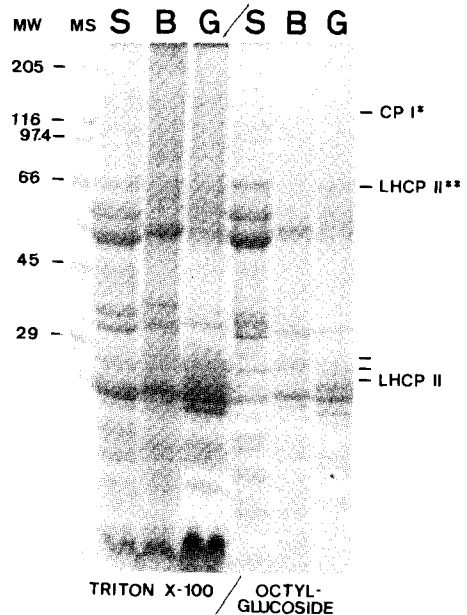


Fig. 4. Polypeptide profiles of *ginseng* (G), *spinach* (S), and *soybean* (B) thylakoids. Polypeptides were analyzed by SDS PAGE of 10-15% polyacrylamide gels. Triton X-100 and octyl-glucoside were used as detergents.

계의 redox capacity 가 빨리 포화됨으로써 pigments 의 photooxidation 이 유발되는 것으로 유추 해 볼 수 있다.

Thylakoid membrane 의 SDS-PAGE protein

Table 3. Inhibitory effects of 2,5-dimetyfuran (2,5-DMF) on photooxidation of chloropyll a,b and carotenoid in thylakoid membrane from *Panax ginseng* C.A. Meyer (conditions: temperature; 25°C, treated time; 3 hrs, light intesity; 20,000 Lux)

Concentration of 2,5-DMF (mM)	Non-bleached chlorophyll (mg/unit thylakoid memb.*)		Non-bleached carotenoid (mg/unit thylakoid memb.)
	Chl.a	Chl.b	Carotenoid
Dark 0.0	7.21 ± 0.01	2.79 ± 0.01	1.28 ± 0.01
Light 0.0	1.14 ± 0.07 (0)**	0.90 ± 0.05 (0)	0.22 ± 0.01 (0)
0.5	3.68 ± 0.03 (42)	2.40 ± 0.01 (79)	0.51 ± 0.00 (27)
1.0	3.79 ± 0.02 (44)	2.50 ± 0.01 (84)	0.56 ± 0.01 (32)
2.0	4.20 ± 0.04 (50)	2.59 ± 0.01 (89)	0.62 ± 0.02 (38)
4.0	4.57 ± 0.05 (57)	2.72 ± 0.04 (96)	0.72 ± 0.02 (47)
6.0	4.56 ± 0.03 (56)	2.58 ± 0.04 (89)	0.90 ± 0.02 (64)
8.0	4.47 ± 0.03 (55)	2.50 ± 0.03 (84)	0.93 ± 0.01 (67)
10.0	4.60 ± 0.05 (57)	2.56 ± 0.04 (88)	0.98 ± 0.02 (72)

* eq. 10 mg chlorophyll

** Inhibition rate of bleaching (%)

pattern 역시 protein band가 숫적으로 적을 뿐만 아니라 band intensity에서도 낮게 나타났으며, 특히 29~35 kD와 55 kD 및 60 kD 근처의 band에서 비교식물과 현저한 유의차를 나타내고 있다 (Fig. 4).

梁 등¹²⁾은 人蔘葉燒病을 유발시키는 주요 active oxygen이 1O_2 이라고 보고하였는데, Table 3에서는 1O_2 의 specific quencher인 2,5-dimethylfuran을 이용하여 人蔘의 chlorophyll-bleaching 억제효과, 즉 1O_2 에 의해 파괴되는 thylakoid pigment 비율이 chl. a가 약 60%, chl. b는 90%, carotenoid는 70%이었으며, 나머지는 superoxide($O_2^{\cdot-}$)나 hydroxyl radical($OH\cdot$)과 같은 oxygen species에 의해 파괴되는 것으로 확인되었다. 또한 1O_2 에 色素 파괴에 있어서 chl. b가 chl. a에 비해 약 30% 정도 높은 것으로 미루어 보아 CP-complex 중에서도 chl. b의 함량이 높은 人蔘 잎의 light harvesting CP-complex가 1O_2 에 의해 가장 먼저 손상됨으로써 人蔘의 葉燒病이 유발되는 것으로 사료된다.

요 약

人蔘葉燒病(leaf-burning disease) 원인과 light-harvesting chlorophyll-protein(LHCP) complex의 solar energy 분배능력과의 상호 연관성을 조사하기 위한 기초 연구로서 人蔘 thylakoid의 chlorophyll-protein(CP) complex의 조성 및 특징을 조사하였다.

人蔘의 CP-complex는 non-denaturing SDS-PAGE 방법에 의해 4개 bands로 분리되었으며 각 band는 Bassi¹⁰⁾와 Dunahay¹¹⁾의 결과에 따라 CPI*(PSI의 reaction center와 LHCP I antennae), CPI(PSI reaction center), LHCP II**(LHCP II)의 oligoform), 그리고 LHCP II(PS II antennae; CP 29, CP 26)로 확인되었다. 인삼의 LHCP II** band는 陽地植物인 spinach, soybean과 비교해 볼 때 오히려 人蔘의 band intensity가 더 높았으며, CPI band는 人蔘에서만 분리되었다. 人蔘 CP-complex band의 absorption 및 fluorescence spectra, chloro-

phyll a/b ratio에서도 비교식물과 차이를 나타내었다.

Thylakoid membrane의 polypeptide 함량은 人蔘에서 비교식물에 비해 현저히 낮은 polypeptide 함량을 나타내었다. SDS-PAGE에 의한 polypeptide pattern은 band의 수나 band intensity에서 비교식물과 차이를 나타내었으며, 특히 29~35 kD, 55 kD과 60 kD 근처에서 현저한 band intensity 차이를 확인하였다. Specific 1O_2 quencher인 2,5-dimethylfuran을 이용한 chlorophyll bleaching inhibition 실험을 통하여 人蔘 葉燒病의 chlorophyll bleaching 과정에서 1O_2 에 의해 chl. a가 60%, chl. b는 90%, 그리고 carotenoid는 70%가 파괴되는 것으로 확인되었다.

인용문헌

1. Howarth, P., Kyle, D.J. and Arntzen, C.J.; *Biochim. Biophys. Acta.* **680**, 343 (1982).
2. Chow, W.A. Telter, A., Chapman, D.J. and Barber, J.; *Biochim. Biophys. Acta.* **638**, 60 (1981).
3. Bennett, J.; *Physicol. Plant*, **60**, 583 (1984).
4. Barber, J.; *Photosynthesis mechanism and Environment*, Elsevier, Amsyterdam, 91 (1985).
5. Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E., and Arntzen, C.J.; *Nature* **291**, 21 (1981).
6. Bennett, J., Steinback, K.E. and Arntzen, C.J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5253 (1980).
7. Steinback, K.E., Bose, S. and Kyle, D.J.; *Arch. Biochim. Biophys.* **216**, 356 (1982).
8. Yang, D.C., Yoo, H.S. and Yoon, J.J.; *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(2), 91 (1987).
9. Yang, D.C., Yoo, H.S. and Yoon, J.J.; *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(2), 101 (1987).
10. Yang, D.C., Kim, M.S. and Lee, S.J.; *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(1), 24 (1987).
11. Yang, D.C., Kim, M.W., Choi, J.D., and Lee, S.J.; *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(1), 92 (1989).
12. Yang, D.C. Kim M.W., Chae, Q., and Kim, M.S.; *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(1), 98 (1989).
13. Kim, D.J.; *Korean Ginseng Culture*, Ilhan, Seoul, 47 (1973).

14. Sun, G., Bailey, D., Jones, M.W., and Markewell, J.: *Plant Physiol.*, **89**, 283 (1989).
15. Camm, E.L. and Green B.L.: *Plant Physiol.*, **67**, 1061 (1981).
16. Dunhay, T.G. and Staehelin, L.A.: *Plant Physiol.*, **78**, 606 (1985).
17. Burke, J.J., Ditto, C.L., and Arntzen, C.J.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **187**, 252 (1978).
18. Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G.M., and Simpson, D.J.: *J. Biol. Chim.* **262**(7), 13333 (1987).
19. Arnon, D.I., *Plant Physiol.*, **24**, 1(1949).
20. Lowary, D.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *J. Biol. Chim.*, **193**, 263 (1951).
21. Boardman, N.K., Anderson, J.M., Bjorkman, O. Goodchild, D.J., Grimme, L.H., and Thorne, S.W.: *Prot. Acta Bio. Ser. A*, **14**, 213 (1974).
22. Boardman, N.K., Anderson, J.M., Thorne, S.W., and Bjorkman, O.: *Carnegie Inst. Washigton Yearb*, **71**, 107 (1972).
23. Boardman, N.K.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 355 (1977).