

# 잔디와 시금치의 Thylakoid Membrane으로부터 엽록소-단백질 복합체의 분리와 그 특성

金炳圭, 張楠基

(서울대학교 師範大學 生物教育科)

**The Isolation and Characterization of Chlorophyll-Protein Complexes  
in Thylakoid Membranes from *Zoysia japonica* and *Spinach oleracea***

*Byeong-Kiu Kim and Nam-Kee Chang*

*(Dept. of Biology, College of Education Seoul National University)*

## ABSTRACT

The chlorophyll-protein complexes were separated from thylakoid membranes of *Spinach oleracea* and *Zoysia japonica* by two gel systems of LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE and LiDodSO<sub>4</sub>/Urea-PAGE under non-denaturing conditions. Seven chlorophyll-protein complexes of CPI\*, CPI, CPII\*, CP47, CP43, CP29 and CPII were fractionated from both *S. oleracea* and *Z. japonica* by LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE. CPI, CP47 and CP43 contained more chlorophyll a than chlorophyll b. The patterns of their absorption spectra at room temperature were similar to that of chlorophyll a, judging by their UV-spectroscopy. On the other hand, CPII\* and CPII contained approximately equimolar quantities of chlorophyll a and b.

Additional five chlorophyll-protein complexes not separated in the LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE system were electrophoretically isolated from both *S. oleracea* and *Z. japonica* by LiDodSO<sub>4</sub>/Urea-PAGE. The chlorophyll-protein complex just above LHCII  $\alpha$  in the gel appears CCII-RC separated recently. 23 kDa and 20 kDa chlorophyll-protein complexes are probably LHCIa and LHCIb as judged from their molecular weight.

Two novel chlorophyll-protein complexes designated "CP17" and "CP16" were fractionated by this gel system. Their molecular weights respectively. Although the stoichiometry of their components and their roles in thylakoid membranes are not apparent, it is thought that they are another kinds of LHCI.

## Abbreviations

- \* BSA : Bovine serum albumin
- \* DTT : Dithiothreitol
- \* Hepcs : N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
- \* LiDodSO<sub>4</sub> : Lithium dodecyl sulfate
- NaDodSO<sub>4</sub> : Sodium dodecyl sulfate \*
- Na<sub>2</sub>EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt
- PMSF : Phenyl methyl sulfonyl fluoride

**TEMED : N, N, N', N'tetramethylethy lenediamine**  
**CCII : Core complex of photosystem II**  
**Chl : Chlorophyll**  
**CP : Chlorophyll-protein complex**  
**FC : Free chlorophyll zone**  
**LHC : Light-harvesting chlorophyll-protein complex**  
**PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis**  
**PS : Photosystem**

## 서 론

엽록체의 thylakoid membrane내에서 엽록소a와 b가 단백질과 결합하여 뚜렷한 chlorophyll-protein complex를 이루고 있다는 사실은 Ogawa 등과 논문출처명기 Thornber 등(1975)에 의해 최초로 밝혀졌다. 이들은 SDS-PAGE를 이용하여 세계의 pigmented band를 분리하였으며, 이것을 electrophoretic mobility의 증가 순으로 CP I, CP II 그리고 free pigment zone(FP)이라고 하였다.<sup>9)</sup>

CPI은 "The heart of PSI"으로 P700-Chl a-protein complex이며 CPII는 엽록소a와 b를 모두 포함하고 photochemical activity를 나타내지 않으며 빛 에너지를 harvesting하는 역할을 한다. 그리고 FC zone은 엽록소와 SDS가 micelle을 이루고 있는 부분이다.<sup>14)</sup> thylakoid membrane으로부터 엽록소-단백질 복합체를 분리하는 방법은 electrophoretic fractionation 이외에도, chromatographic, centrifugol fractionation 등이 있으나, 일반적으로 짧은 시간내에 간단하게 엽록소-단백질 복합체를 분리할 수 있기때문에 surfactant의 존재하에 non-denaturing electrophoresis를 많이 이용한다.

Chlorophyll-protein complex 분리의 역사적 과정을 살펴보면, Ogawa와 Thornber가 두개의 엽록소-단백질 복합체를 분리한 이래 surfactant로 LiD<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>나 Octylglucoside를 사용하여 다섯 개의 엽록소-단백질 복합체를 분리하게 되었고<sup>12, 36)</sup>, 1987년에는 N-lauryl-β-iminodipropionate를 사용하여 일곱 개의 엽록소-복합체를 분리하였다.<sup>36)</sup> Thylakoid membrane에는 두 가지 형태의 Photochemical unit가 존재하는데, 그것은 PS I 과 PS II 이다. PS I 에 존재하는 엽록소-단백질복합체는 CPI(P700-Chl a-protein)과 LHCI이다.<sup>23)</sup> CPI은 P700, β-carotene, 엽록소a 분자와 60-70 kDa reaction center polypeptide, 그리고 25, 20, 18, 1

6, 8 kDa polypeptide로 구성되어 있다.<sup>16, 18, 28)</sup>

그리고 PSI의 Reaction center protein은 iron-sulfur protein 임이 밝혀졌다.<sup>20)</sup> LHCI은 LHCIa와 LHCIb의 두가지 형태가 있으며, 세계의 20-23kDa의 polypeptide로 구성 되어 있다.<sup>23)</sup> PSII에도 구조적, 기능적으로 독립적인 두 가지 형태가 존재하는데, grana partition에 주로 있는 것이 PSIIα이며 stroma에 노출된 막에있는 것이 PSIIβ인데, 이것은 PSIIα보다 크기가 작다. 이제까지 밝혀진 바로는 PSII에는 CCII와 LHCI의 엽록소-단백질 복합체가 존재한다. CCII에는 두가지 형태의 pigment-protein complex인 CCIIα와 CCIIβ(CP47, CP43)가 전기영동으로 분리되었는데, 약 30개의 Chl a 분자와 한 개의 P680분자가 각각의 CCII complex에 위치하는 것으로 추정되며, 그 유전자는 P700-Chl a-protein 유전자와 마찬가지로 plastid chromosome상에 있다.<sup>6)</sup> 최근 CP47과 CP43이 없는 광화학적으로 활성을 지닌 PSII reaction center가 분리되어졌는데, 이것은 D1, D2 polypeptide (Herbicide-binding protein), cytochrome b-559, 엽록소 그리고 pheophytin a로 구성되어 있다.<sup>36)</sup> LHCI에도 두 가지가 있는데 LHCIα(CP29)는 Chl a / b-protein으로 CCII와 밀접하게 관련되어 있을 것이라고 생각되나 그 기능은 명확하지 않다. LHCβ는 light-harvesting Chl a / b-protein으로 thylakoid membrane에서 약 1/2의 엽록소와 1/3의 thylakoid membrane protein을 차지한다.<sup>18, 35)</sup> LHCIβ를 구성하는 Polypeptide는 연구자나 식물에 따라 다소 심한 차이를 나타내어, 그 polypeptide조성은 2-5개 사이이고 분자량은 27-30kDa의 범위이다.<sup>18)</sup> LHC의 기능은 1) light harvesting antenna 2) 양이온(Mg<sup>++</sup>)의 매개로 grana stacking 3) 두 photosystem으로 여기 에너지의 분배 조절, 즉 state I-state II transition등의 역할을 한다.<sup>9, 11, 31)</sup> LHC유전자는 핵의 DNA상에 있고 세포질 전구체로 합성되

어 post-translational modification 후에 엽록체로 운반되며, 그 mRNA 양은 phytochrome과 빛에 의해 조절된다. (8, 9, 25, 27)

Thylakoid membrane 내에 있는 supramolecular complex는 분포에 있어서 현저한 lateral heterogeneity를 나타낸다. PSII $\alpha$ 와 이와 관련된 LHCII  $\beta$ 는 주로 stacked grana region에 위치하고, PSI와 PSII $\beta$ 는 stroma에 노출된 unstacked membrane에 존재한다.<sup>2, 3)</sup> 이러한 thylakoid membrane의 Lateral asymmetry는 thylakoid membrane 구조의 형성과 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어지고 있다. 그리고 thylakoid membrane의 topography는 정적으로 존재하는 것이 아니고 막단백질의 인산화로 구조가 변한다.<sup>10)</sup> 그 예로 light harvesting complex(LHCII $\beta$ ) polypeptide의 인산화는 막 표면에서 전기적 성질의 변화를 일으켜 PSII와 연관되어 있던 LHCII의 한 subpopulation을 grana에서 stroma lamellae로 이동시킨다.<sup>22)</sup> 인산화에 의한 이러한 LHCII의 이동은 PSII와 PSI사이의 여기에너지 분배에 역할을 한다고 보고되어 졌다.

<sup>9, 32)</sup> LHCII 외에도 PSII components, CP43 apoprotein, D1, D2 그리고 10-11kDa의 단백질도 인산화가 일어나며, 이로 인하여 여러 광화학적 기능의 변화를 초래할 수도 있다.<sup>17, 21)</sup>

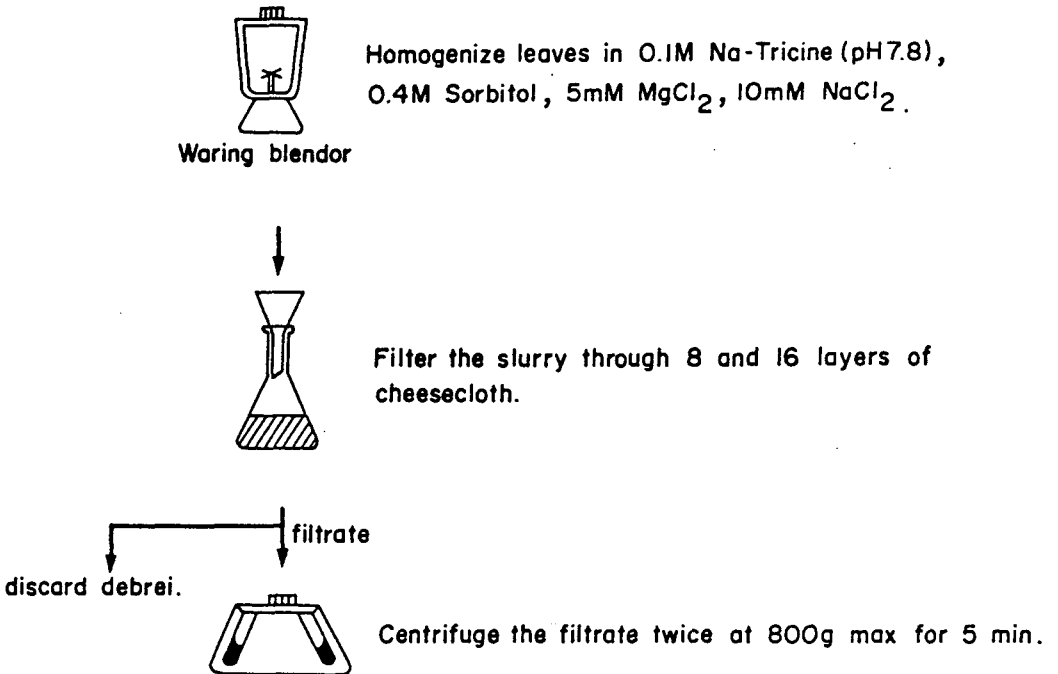
광합성 기관에서 빛에너지의 화학에너지로의 전환은 엽록소분자와 이와 관련된 분자들사이의 관계를 나타내는 분자 수준의 기하학이 밝혀졌을 때만이 완전히 이해 가능하다고 생각되어져 왔다. 그렇게 하기 위해서는 먼저 thylakoid membrane 내에 존재하고 있는 모든 Chl-protein 복합체의 종류를 분리하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 이러한 데 초점을 두고, 시금치와 한국산 잔디를 이용하여 Chl-protein 복합체를 전기영동으로 분리하여 몇가지 그 특성을 살펴보았다.

## 실험 재료 및 방법

### 1) 식물 재료

시금치 (*Spinach oleracea L.*) 와 잔디 (*Zoysia japonica Steud.*)를 실험재료로 사용하였다.

## ISOLATION SCHEME FOR THE THYLAKOID MEMBRANES FROM LEAVES



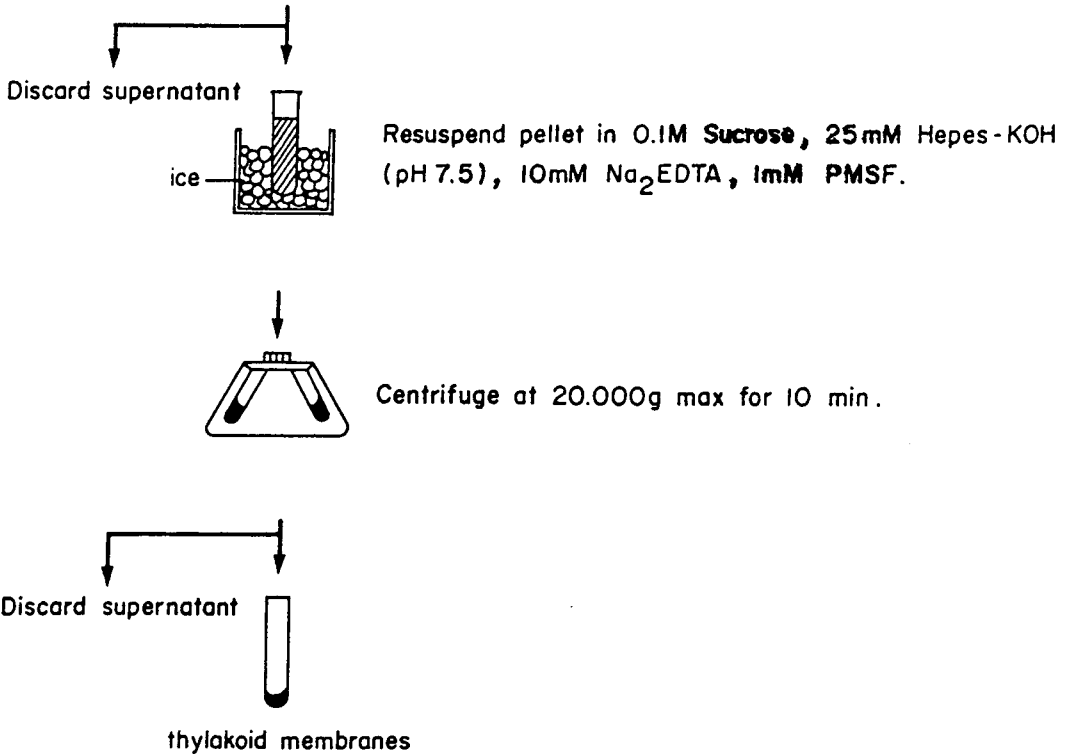


Fig.1. Scheme for the isolation of thylakoid membranes from leaves.

## 2) 엽록체의 분리

엽록체는 Burke 등(1978)의 방법을 약간 변형하여 시금치와 잔디의 잎에서 각각 분리하였다. 시금치와 잔디잎 50g을 증류수로 씻은 후, 물기를 제거하고 얼음속에 냉각시킨 Waring blender에 100ml의 0.1M Na-Tricine(pH7.8), 0.4M sorbitol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl을 포함하는 용액을 함께 넣고 20초간 마쇄하였다. 잔디잎의 경우 60초간 Waring blender에서 마쇄한 것을 제외하고 시금치의 엽록체 분리 과정과 동일하다. 마쇄를 끝내고, 먼저 8겹의 cheesecloth로 거른 후 다시 16겹으로 걸러 여과액을 800gmax에서 5분간 원심분리하여 엽록체를 얻었다. 엽록체를 위의 동일한 용액으로 재 현탁시켜 한번 씻은 후 다시 원심분리하였다. 이 침강된 엽록체를 0.1M sucrose, 25mM Hepes-KOH(pH7.5), 10mM Na<sub>2</sub>DETA, 1mM PMSF를 포함하는 용액으로 재 현탁시킨 후, 이 homogenate를 20,000 gmax

로 원심분리하여 thylakoid membrane을 얻었다. 이러한 모든 실험과정은 4°C이하에서 수행되었다.

## 3) 엽록소 정량

분리된 thylakoid membrane pellet에 1ml의 위의 thylakoid membrane homogenation용액을 첨가하여 현탁시킨 후, 이 용액을 50 $\mu$ l 취하여 3ml의 80% acetone 용액에 섞어 엽록소를 추출하였다. 그후, 원심분리하여 침전물을 제거하고 아래의 Arnon의 식<sup>5)</sup>을 이용하여 엽록소를 spectrophotometer로 정량하였다.

$$\ast \text{ 엽록소a (mg/ml)} = 0.0127 \times A_{663} - 0.00269 \times A_{645}$$

$$\ast \text{ 엽록소b (mg/ml)} = 0.0229 \times A_{645} - 0.00468 \times A_{663}$$

$$\ast \text{ 총 엽록소 (mg/ml)} = 0.0202 \times A_{645} + 0.00802 \times A_{663}$$

#### 4) Chlorophyll-complex의 분리

Laemmli의 방법을 약간 변형시킨 두가지 형태의 gel system을 사용하였다.

##### a. System I (LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE)

이 gel system은 Delepelaire와 Chua의 방법<sup>14)</sup>을 따른 것이며, NaDod-SO<sub>4</sub>는 stacking gel, resolving gel 그리고 upper와 lower reservoir buffer에서 제외시켰다. stacking gel(1×140×20mm)은 5%acrylamide를 포함시켰고 resolving gel(1×140×900mm)은 7.5-15% linear gradient acrylamide gel이었다. 그리고 NaDodSO<sub>4</sub> 대신에, LiDodSO<sub>4</sub>를 stacking gel, resolving gel, upper buffer와 lower reservoir buffer에는 최종 농도가 0.1%(W/V)되게 첨가하였다. Gelation은 0.05% ammonium persulfate, 0.033%(V/V) TEMED로 하였다.

##### b. System II (LiDodSO<sub>4</sub> / Urea-PAGE)

이 gel system은 stacking과 resolving gel에 5M Urea가 포함된다는 것외에는 위 gel system과 동일하다.

#### 5) 전기영동

Thylakoid membrane을 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50mM DTT, 12% sucrose, 2% LiDodSO<sub>4</sub>에 녹여 최종 chlorophyll 농도가 1mg/ml가 되게 하고, 엽록소 : LiDodSO<sub>4</sub>의 비(W/W)는 1 : 20이 되게 하였다. 그리고 엽록소의 loading량은 100μg으로 하였다. 전기영동은 암조건 0°C 이하, nondenaturing condition에서 20mA constant current setting으로 8시간 동안 실시하였다.

#### 6) Chlorophyll-protein의 흡수 스펙트럼 측정.

Gel상에 분리된 *Chl-protein* 복합체를 잘라낸 후, 이 gel slice를 0.1% NaDodSO<sub>4</sub> 용액 속에서 homogenation하고 침전물을 원심분리로 제거한 후, acetone을 최종농도 80%(V/V)가 되게 첨가하여 분석시료로 사용하였다. 각 *Chl-protein* 복합체의 흡수 스펙트럼은 Shimadzu UV-30 Spectrophotometer로 700-360nm까지 scanning하였다.

#### 7) Gel 염색

Gel은 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하였다.

#### 8) 시 약

B.S.A., coomassie brilliant blue R, α-chimo-

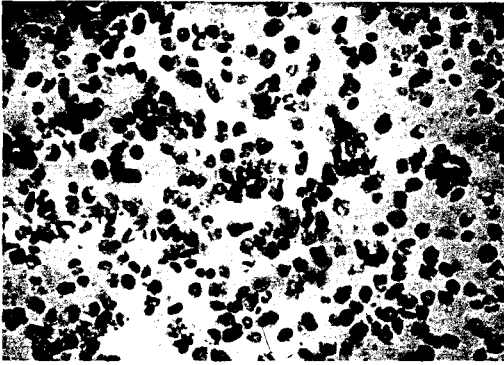
trypsinogen-A, DTT, glycine, hemoglobin, Hepes, LiDodSO<sub>4</sub>, N,N-methylene-bis-Acrylamide, myosin, NaDodSO<sub>4</sub>, ovabumin, PMSF, tricine, tris (Hydroxymethyl)aminomethene은 Sigma(ST. Louis, U.S.A.)에서 구입하였고, acrylamide, ammonium persulfate, TEMED, urea는 E, Merk (Darmstadt, West Germany)제품이었다. 그외 Na<sub>2</sub> EDTA, sucrose는 haysashi pure chemical Industries, Ltd(Osaka, Japan)것을 사용하였다.

## 결 과

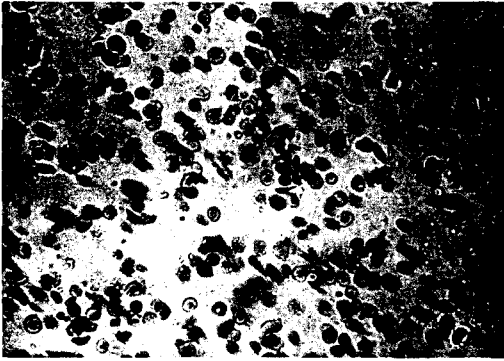
#### 1) LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE에 의한 chlorophyll-protein complex의 분리와 spectral Analysis

전기영동시 엽록소-단백질 복합체의 안정성은 낮은 온도에서 현저하게 증가한다.<sup>15)</sup> LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE를 사용하여 0°C에서 시금치와 잔디로부터 FC를 제외한 7개의 pigmented band를 분리하였는데(Fig. 3a), 이것을 mobility 순으로, CPI\*, CPI, CPII\*, CP47, CP43, CP29, 그리고 CPII라고 명명하였다. 이 결과는 surfactant로 LiDodSO<sub>4</sub>나 octylglucoside를 사용한 다른 연구자의 결과<sup>15, 34)</sup>와 일치한다. 그리고 CPII의 polypeptide 조성을 분석하기 위해 preparative gel로부터 CPII를 잘라내어 다시 LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE로 전기영동한 후, 이것을 다시 잘라내어 denaturing condition에서 NaDodSO<sub>4</sub>-PAGE한 결과, CP29를 제외한 LHClIB의 polypeptide는 시금치가 4개, 잔디가 3개였다(Fig.3b).

각각 분리된 엽록소-단백질복합체를 이용하여 측정된 흡수 스펙트럼의 양상은 Fig.4에 나타나 있다. CPI의 흡수 스펙트럼은 엽록소 a의 흡수 스펙트럼과 거의 동일한 양상을 보였고, 최대 흡수도(absorption maxima)는 가시광선 영역의 청색부분(blue-violet region)에서 430nm, 그리고 적색지역(orange-red region)에서 663nm였다. CPII\*의 흡수 스펙트럼은 CPII의 흡수 스펙트럼과 비슷한 양상을 나타내었으며, 적색부분 663nm, 청색부분 432nm, 456(shoulder)에서 최대 흡수도를 보였다. CP47과 CP43은 시금치, 잔디 모두에서 두 개의 흡수 스펙트럼이 비슷한 형태였다. 그리고 peak는 적색부분에서 662nm이고 청색부분에서 430nm에 존재하였다. CP47과 CP43의 스펙트럼에서 특이한 것은 460nm 근처에서 작은 shoulder(soret peak)가 나타났는데, 이것은 β-carotene때문인 것 같다.

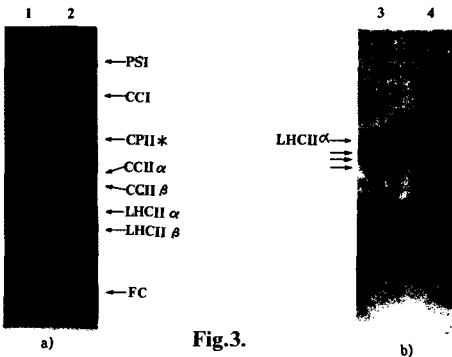


a)



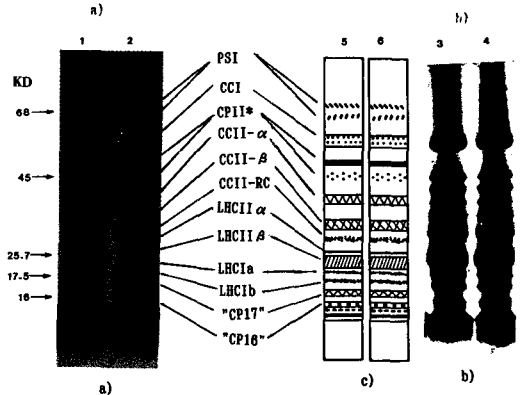
b)

**Fig.2.**The isolated chloroplasts(x400) of *S.oleracea* (a) and *Z'japonica*(b).



**Fig.3.**

b)



**Fig.5.**

**Fig.3.a)** Chlorophyll-protein complexes from the thylakoid membranes of *S.oleracea* and *Z.japonica*. Analysis was by LiDodSO<sub>4</sub>/PAGE at 0°C. Lane 1, *s,0leracea*. Lane 2, *Z,japonica*. Gel were not stained.

**b)** Polypeptide patterns of CPII. After one cycle of reelectrophoresis by LiDodSO<sub>4</sub>/PAGE, Analysis was by NaDodSO<sub>4</sub>-PAGE under denaturing conditions. Gel were stained with Coomassie Brilliant Blue R. Lane3 and 4, Polypeptides of CPII of *S,oleracea* and *Z,japonica*, respectively.

**Fig.5.**High resolution LiDodSO<sub>4</sub>/Urea-polyacrylamide gel(7.5-15) electrophoresis of *S,oleracea* and *Z,japonica* thylakoid membranes.

**a).** Unstained polyacrylamide gel showing the chl-protein complexes of *S,oleracea*(lane1) and *Z,japonica* thylakoid membranes(lane2).

**b).** Stained polyacrylamide gel. Lane 3, *s, oleracea*. lane 4, *Z,japonica*.

**c).** Schematic representation of the chl-protein complexes in the thylakoid membranes of *S,oleracea* (lane 5) and *Z,japonica*(lane 6).

Molecular weight markers are BSA (68 kDa), ovalbumin(45kDa), chymotrypsinogen(25.7kDa), myoglobin (16kDa).

CPII는 엽록소a와 엽록소b가 동시에 존재하는 스펙트럼의 형태이며, 적색지역에서 663nm, 청색부분에서 434nm, 458nm(shoulder)에서 최대 흡수도를 보였다.

시금치와 잔디에서 각 Chl-protein복합체에 포함된 상대적인 엽록소 분포와 엽록소a/b 비율은 Table.1.에 나타나있다. 엽록소의 상대적 분포에 있어서, CPII(CP29 포함)가 가장 많은 엽록소를 포함하고 있고, 다음으로 FC, CPI순이며 CPII\* CP47와 CP43은 비교적 적은 엽록소를 포함하고 있었다. 이 결과는 Delepelair등(1981)의 실험결과와 비슷하나 Green등(1988)과 Tanaka등(1987)의 보고에 비해 CPI의 엽록소 함량이 적고 CPII의 엽록소 함량이 더 많다.

그리고 엽록소 a/b 비율을 보면 CPI, CP47, CP43에는 주로 엽록소a가 분포하는 것으로 나타났고, CPII\*와 CPII에는 엽록소a와 b가 거의 비슷한 수준으로 존재하였다. 그외, FC도 엽록소a가 엽록소b보다 약 3배 정도로 많았다.

## 2) High resolution

LiDodSO<sub>4</sub> / Urea-polyacrylamide gel electrophoresis 에 의한 chlorophyll-protein complex의 분리

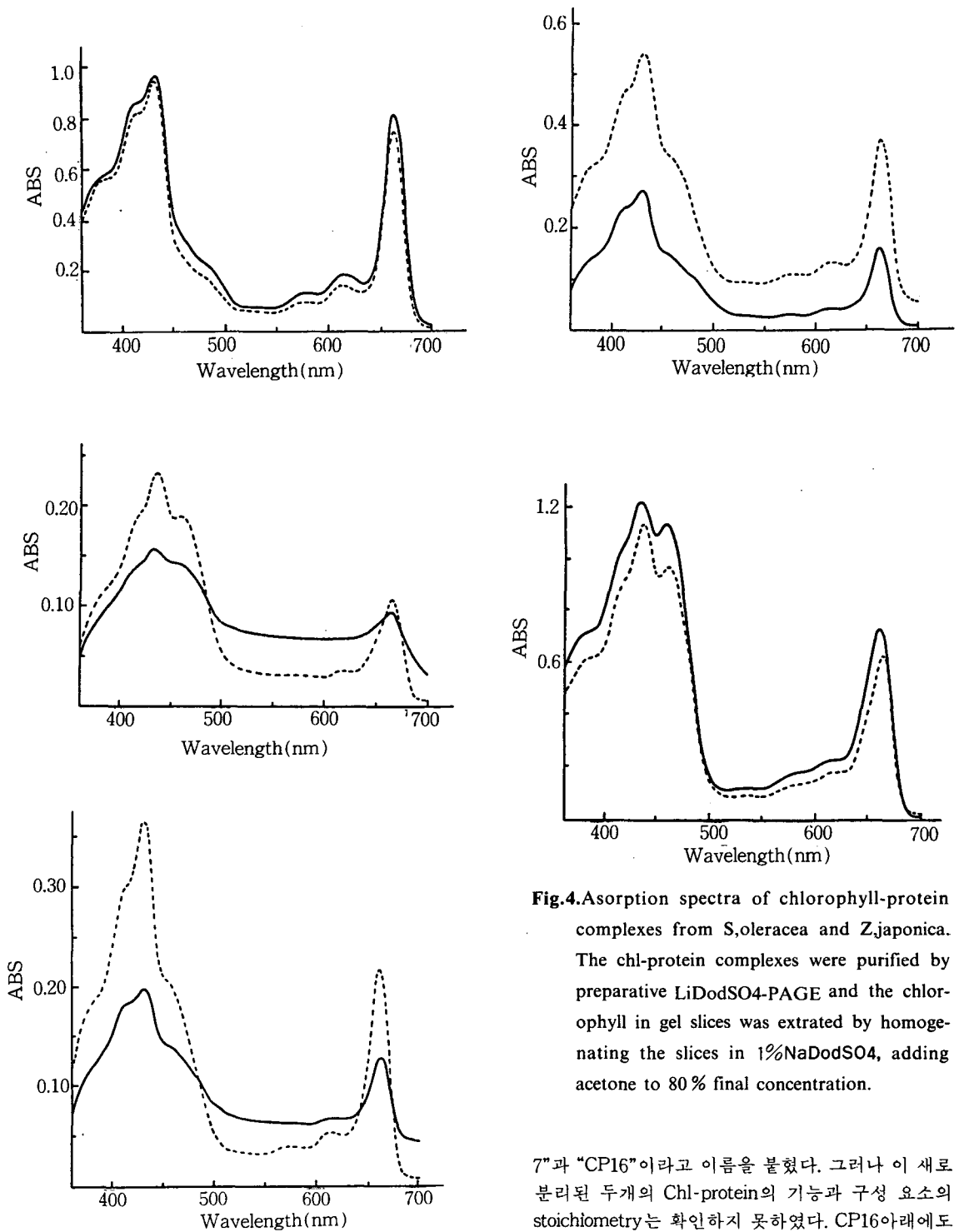
Chlorophyll-binding protein은 thylakoid membrane의 내재성 단백질이기 때문에 그 아미노산 서열중에 소수성을 나타내는 부분이 많이 존재한다<sup>35)</sup> 그러므로 전기영동으로 Thylakoid membrane을 분석할 때, 다른 막단백질 분석과 마찬가지로

로, gel에 urea를 포함시키면 단백질의 resolution이 현저하게 증가한다.<sup>30)</sup> 이 gel system을 사용하여 Chl-protein 복합체를 분석한 결과, PSI particle을 제외한 14개의 Chl-protein복합체를 분리하였다 (Fig.5a). 이제까지 발표된 다른 결과와 비교하여 분자량과 gel상에서의 분리양상으로 추정된, 잠정적인 각 Chl-protein 복합체의 정체를 Fig.5a에서 나타내었다. 가장 위에 있는 색소 band는 PSI-200과 PSl110 particle이고 그아래 CPI은 위의 LiDodSO<sub>4</sub> PAGE에서 분리된바 있는 P700-Chl-a-protein이며 PSI-65라고도 한다. 그리고 CPI 바로 아래 보이는 두 개의 band는 LHC의 oligomer 형태인 것 같다. 또 그 다음으로 CCII- $\alpha$ 와 CCII- $\beta$ 로 보이는 것이 분리 되었으며, 이 밑에 있는 것은 분자량으로 추정해 볼 때, 1987년 glycosidic surfactant를 사용하여 분리된 CcII-RC인 것 같다<sup>35)</sup> 그리고 LHCII- $\alpha$ 와 LHCII- $\beta$ 로 구성된 LHC아래 분자량 23-20kDa사이에 두 개의 Chl-protein복합체가 나타났는데, 이것은 PSI에 결합되어 있는 light-harvesting chl a/b-protein으로 23kDa complex는 LHCIa이고 20kDa는 LHCIb로 생각된다. 이 복합체는 thylakoid membrane을 sucrose gradient centrifugation을 하여 PSI을 얻은 후, 이것을 전기영동하여 gel상에서 분리한 적은 있으나<sup>24)</sup> thylakoid membrane extract 전체를 이용하여 분리한 사람은 없었다. 또 LHCI아래에 이제까지 확인된 바가 없는 새로운 두 개의 뚜렷한 Chl-protein이 나타났는데, 이것의 분자량이 각각 17kDa와 16kDa이므로 "CPI

**Table 1.**The relative chlorophyll content and chl a/b ratio in the Chl-protein complexes from *S.oleracea* and *Z.japonica*

Chl-protein Complexes	Relative Chl content (%)		Chl a/b	
	spinach	Korean lawn grass	Spinach	Korean lawn grass
CPI	4.95	5.40	19.28	19.96
CPII*	0.56	0.54	0.88	1.73
CP47	0.50	0.90	2.54	4.34
CP43	0.69	1.48	5.33	4.13
CPII	56.13	56.60	1.33	1.49
FC	37.17	35.08	3.00	3.42

\* CPII contains CP29.



**Fig.4.** Absorption spectra of chlorophyll-protein complexes from *S. oleracea* and *Z. japonica*. The chl-protein complexes were purified by preparative LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE and the chlorophyll in gel slices was extracted by homogenating the slices in 1% NaDodSO<sub>4</sub>, adding acetone to 80% final concentration.

7"과 "CP16"이라고 이름을 붙였다. 그러나 이 새로 분리된 두개의 Chl-protein의 기능과 구성 요소의 stoichiometry는 확인하지 못하였다. CP16아래에도



희미한 색소띠가 보이거나 염색된 gel과 비교해 볼 때 이 Chl-protein complex가 정말로 존재하는지 여부의 실재성은 확실치 않다.

## 고 찰

엽록체의 분리방법에는 크게 두가지가 있다. 하나는 식물조직을 기계적으로 파괴하여 엽록체를 분리하는 방법이고, 다른 하나는 세포벽 분해효소를 이용하여 Protoplast로부터 엽록체를 얻는 방법이다. 이 방법은 각각의 장단점이 있으나, Waring blender를 이용한 기계적 방법이 간단하고 비용도 적게 들기 때문에, 이 실험에서는 후자의 방법을 이용하였다. 식물의 잎을 blending할 때, 시금치는 짧은 시간동안 마쇄해도 쉽게 조직이 파괴되나, 잔디의 경우는 잎 조직이 매우 단단하기 때문에 비교적 오랫동안 마쇄해야 한다. 그리고 마쇄액을 여과한 후, 원심분리할 때 원심력을 1000 g<sub>max</sub> 이상으로 하면 조직의 작은 파편들이 침강되는 경우가 있으므로, 분리된 엽록체의 순수도를 떨어뜨릴 수 있다.

Nondenaturing LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE에 의해 시금치와 잔디로부터 7개의 엽록소-단백질 복합체가 분리되었다(Fig.4a). CPI\*은 PS I의 sub-particle이며, CPI은 P700-엽록소 a를 포함하는 PSI의 core complex인데, 이것은 그 흡수 스펙트럼과 엽록소 a/b의 분석결과(Fig.4a., Table.1)가 이 사실을 뒷받침해 주고있다. CPII\*는 그 Polypeptide 조성은 분석하지 못했지만, 흡수 스펙트럼양상과 엽록소 a와 b의 비율로 보아 LHCI의 Oligomer 형태로 생각된다. 광화학적으로 활성을 지니고 있는 엽록소-단백질 복합체는 보통 엽록소a를 엽록소b보다 훨씬 많이 포함하고 있는 것이 특징인데, 이것으로 미루어보아 CPII\*아래 있는 두 개의 색소띠는 PSII의 core complex인 CC II $\alpha$ 와 CC I $\beta$ 임을 알 수 있다. 그리고 CC II $\alpha$ 와 CC II $\beta$ 의 흡수 스펙트럼에서 460nm 부근에 soret peak가 나타나는 것으로 보아 이 두 complex는  $\beta$ -carotene을 포함하고 있는 것 같다.

LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE로 분리된 엽록소-단백질 복합체의 정체를 특성 밝히기 위해 상온에서 그 스펙트럼을 측정하였는데, 그 결과는 다른 보고(Suss 등 (1980))와 약간 차이를 보였다. 먼저 최대 흡수파장이 왼쪽으로 약간 Shift 되어 나타났고,

엽록소a와 b가 동시에 존재하는 CPII\*와 CPII의 흡수 스펙트럼은 적색지역 652nm부근에서 엽록소 b에 의한 shoulder가 나타나지 않았다. 엽록소의 흡수 스펙트럼은 추출용매의 환경에 따라 크게 영향을 받는데<sup>19)</sup>, 이것은 이런 원인에서 기인한 것 같다. 소수성 아미노산이 많이 포함된 단백질을 전기영동으로 분석할 때, gel에 urea를 포함시키면 단백질의 소수성(hydrophobicity) 정도 뿐만 아니라, 아미노산 하나의 차이에 의해서도 단백질이 분리될 정도로 해상력이 증가된다.<sup>30)</sup> LiDodSO<sub>4</sub>/Urea -PAGE를 이용한 본 실험은 엽록소를 다른 사람보다 약 4배가 많은 100 $\mu$ g 정도를 loading했다는 점과 전기영동을 4 $^{\circ}$ C가 아닌 0 $^{\circ}$ C에서 했다는 사실이 보통 사용하는 방법과 다르다. 이렇게 하여 LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE보다 더 많은 엽록소-단백질 복합체를 분리하였는데, 다른 것은 위의 LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE 결과나 그 밖의 결과<sup>12, 17)</sup>와 별 차이가 없으나, 특이한 것은 LHCI 아래에 있는 4개의 엽록소-단백질 복합체이다. 이것중에 23kDa와 20kDa complex는 그 분자량으로 미루어 보아 각각 LHCIa와 LHCIb로 추정되며, 이것은 thylakoid membrane extract 전체를 전기영동하여 분리된 적은 없다. 그리고 "CP17"과 "CP16"이라고 이름붙인 17kDa, 16kDa complex는 그 기능이 무엇이며, PSI와 PSII중 어디에서 기원했는지는 확인하지 못하였으나 여러가지 자료를 검토해 볼 때, PSII에서 기원한 새로운 LHCI의 종류인 것 같다. 왜냐하면, PSII의 엽록소-단백질 복합체는 비교적 상세하게 오랫동안 연구된 데 비해, PSI의 LHCI는 비교적 최근에 확인되었고, PSI의 polypeptide중에는 그 분자량이 CP17, CP16과 비슷한 것이 존재하기 때문이다. PSI의 subunit을 보면, 고등식물에서 엽록소 결합-단백질로 PSI reaction polypeptide, LHCIa, LHCIb가 있고, 비엽록소-단백질로는 19kDa, 16kDa, 14kDa, 10kDa 그리고 8kDa가 존재하며, cyanobacteria에서는 비엽록소-단백질로 18kDa, 17.7kDa, 16kDa, 10kDa가 있다.<sup>6)</sup> 연구자나 실험조건에 따라 생기는 실험상의 변이를 감안한다면, 이것중에서 19kDa와 16kDa polypeptide가 새로 분리된 CP17와 CP16과 그 분자량이 비슷하다고 할 수 있다. PSI를 분리하고 그 구성요소를 밝히는 실험과정은 많은 시간이 소요되므로, 이 과정속에서 다른 엽록소-단백질 복합체보다 더 약하게 비공유 결합으로 붙어있던 엽록소분자들이 모두 유리되어

버린다면 실제 세포내에서 엽록소와 결합해있던 단백질들이 비엽록소-단백질로 오인될 수도 있을 것이다. 실제로 각 엽록소-단백질 복합체에 따라 여기에 결합되어 있는 엽록소의 안정성에는 차이가 있다.<sup>15)</sup> 그러므로 새로 분리된 CP17과 CP16은 이제까지 non-chlorophyll-protein으로 판명되었던 또 다른 LHCI일 가능성이 있다. 만약 이것이 사실이라면 이제까지 제시된 thylakoid membrane에서 PSII 구성요소사이의 관계를 나타내는 model인 분자수준의 기하학에 변형이 있어야 함은 불가피하다.

이 실험에서 새로 분리된 엽록소-단백질 복합체

를 포함한, 고등식물에 존재하는 엽록소-단백질 복합체의 종류는 아래의 Table.2에 나타내었다.

시금치와 잔디의 엽록소-단백질 복합체를 비교해 보면, 각 complex에 결합하여 있는 엽록소의 양과 비율의 stoichiometry등에는 차이가 약간 있으나, 이것을 제외하고는 크게 차이나는 것은 별로 없었다. 이것은 C3 식물인 시금치와 C4식물인 잔디가 광합성 생리에 있어서 상당한 차이가 있음에도 불구하고 엽록소-단백질 복합체가 진화상 공통의 기원을 가졌다는 사실<sup>1)</sup>을 암시한다.

**Table.2.**The photosynthetic pigment-protein complexes of higher plants.

	CP complex	Other names for complex
PSI	CCI	CPI ; PS-65 ; P700-Chl a-protein ; PSI reaction center ;
	LHCIa	CP 。
	LHCII	LHCIIb "CP17" "CP16"
PSII	CCII.	CCII-RC
		CCII $\alpha$ CPIII ; CP47 ; Chla-P2
		CCII $\beta$ CPIV ; CP43 ; Chla-P3
	LHCII	LHCII $\alpha$
		LHCII $\beta$ CPII ; LHCP ; LHC : Chla / b-P2 ; Light-harvesting Chl a / b-protein

## 요 약

시금치(*Spinach oleracea*)와 잔디(*Zoysia japonica*)의 thylakoid membrane으로부터 LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE와 LiDodSO<sub>4</sub> / Urea-PAGE를 이용하여 엽록소-단백질 복합체를 분리하였다. LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE에 의해서는 CPI\*, CPI, CP47, CP43, CP29와 CPII가 시금치와 잔디에서 모두 분리되었다. 그리고 분리된 각 엽록소-단백질 복합체로부터 엽록소를 추출하여 상온에서의 흡수 스펙트럼과 각 복합체의 엽록소조성을 UV-Spectrophotometer로 조사하였다. 그 결과, CPI, CP47과 CP43에는

엽록소 a가 많았고, 흡수 스펙트럼의 양상도 엽록소 a의 경우와 비슷하였다. 반면에, CPII\*와 CPII에는 엽록소a와 b가 거의 비슷한 수준으로 존재하였다.

LiDodSO<sub>4</sub> / Urea-PAGE에 의해서는 더 많은 엽록소-단백질 복합체가 분리되었다. 이들 중에서 LiDodSO<sub>4</sub>-PAGE system에서 나타나지 않은 다섯 개의 엽록소-단백질복합체가 시금치와 잔디에서 분리되었는데, LHCII $\alpha$  위에 있는 것은 최근에 알려진 CCII-RC이고 LHCII $\beta$  아래의 분자량이 23kDa, 20kDa인 엽록소-단백질 복합체는 LHCIIa와 LHCIIb로 생각된다. 그리고 새로 분리된 분자량 17kDa,

16kDa의 복합체는 LHCI의 또다른 종류들로 사료되거나 이것들의 정확한 기원, 구성요소, 광합성에서의 역할은 명확하지 않다.

## 참 고 문 헌

- 1). Anastasios, M and J.N. Anderson. 1983. Structural and functional organization of the photosystems in spinach chloroplasts. *BBA*, 7 24, 473-484.
- 2). Anderson, J.M. 1982. The role of chlorophyll-protein complexes in the function and structure of chloroplast. *Mol. Cell. Biochem.* 4 6, 161-172.
- 3). Anderson, J.M., et al. 1983. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *PNAS*. 80, 745-749.
- 4). Anderson, J.M., et al. 1987. Immunological cross-reactivity between the light-harvesting chlorophyll a/b-proteins of a marine green alga and spinach. *Physiol. Plantarum*. 70, 97-602.
- 5). Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in chloroplasts. ; Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 24, 1-15.
- 6). Barber, J. 1987. in *Topics in photosynthesis*, Vol. 8, The light reactions. Elsevier, New York. pp 495-525.
- 7). Bengis, C. and N. Nelson. 1977. Subunit Structure of chloroplast photosystem I reaction center. *J. Biol. Chem.* 252, 4564-4569.
- 8). Bennett, J. 1981. Biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem.* 118, 61-70.
- 9). Bennett, J. 1983. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochem. J.* 212, 1-13.
- 10). Black, M.T. 1986. Changes of topology and function of thylakoid membranes following membrane protein phosphorylation. *Planta*. 168, 330-336.
- 11). Burke, J.J., et al. 1978. Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 252-263.
- 12). Camm, E.L. and B.R. Green. 1981. Widespread distribution of minor chlorophyll-protein complexes in some plants and algae. *Plant Physiol.* 67, 1061-1063.
- 13). Cuming, A.C. and J. Bennet. 1981. biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem.* 118, 71-80.
- 14). Delepelaire, P., et al. 1979. Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4°C: Characterization of two additional chlorophyll a-protein complexes. *PNAS*. 76, 111-115.
- 15). Delepelaire, P., et al. 1981. Electrophoretic purification of chlorophyll a/b-protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptide composition. *J. Biol. Chem.* 256, 9300-9307.
- 16). Dunahay, T.G., et al. 1985. Isolation of photosystem I complexes from octyl glucoside/sodium dodecyl sulfate solubilized spinach thylakoids. *Plant. Physiol.* 78, 606-613.
- 17). Greene, B.A., D.R. Allred, D.T. Morishige and L.A. Staehelin. 1988. Hierarchical response of light harvesting chlorophyll-proteins in a light-sensitive chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol.* 87, 357-364.
- 18). Glazer, A.N. 1983. Comparative biochemistry of photosynthetic light harvesting systems. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 125-157.
- 19). Hipkins, M.F. et al. 1986. in *Photosynthesis ; energy transduction*. IRL press, Oxford. pp 9-26.
- 20). Hoj, P.B., et al. 1986. The 110-kDa reaction center protein of photosystem I, P700-chlorophyll a-protein 1, is an iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.* 261, 14292-14300.
- 21). Ikeuchi, M., et al. 1987. Phosphorylation of photosystem II components, CP43 apoprotein, D1, D2, and 10 to 11 kilodalton protein in chloroplast thylakoids of higher plants. *Plant. Physiol.* 85, 638-642.
- 22). Kyle, D.J., et al. 1984. Movement of a subpopulation of the light harvesting complex

- from grana to stroma lamellae as a consequence of its phosphorylation *BBA*. 765, 89-96.
- 23). Lam,E.,et al. 1984. Isolation and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b protein complex associated with photosystem I. *Plant.Physiol.*74, 650-655.
  - 24). Lam,E.,et al. 1984. Chlorophyll a/b proteins of photosystem I. *FEBS Letter*. 168,10-14.
  - 25). Mathis,J.N.,et al. 1987. Regulation of light-harvesting chlorophyll protein biosynthesis in greening seedlings. *Plant. Physiol.*85,971-977.
  - 26). Mullet,J.E.,et al. 1980. Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.* 65, 814-822.
  - 27). Oelmuller,R.,et al. 1987. Inhibition and promotion by light of the accumulation of translatable mRNA of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II. *Planta*. 172, 60-70.
  - 28). Oriz,W.,et al. 1985. Topography of the protein complexes of the chloroplast thylakoid membrane. *Plant.Physiol.* 77,389-397.
  - 29). Packham,N.K. 1987. Phosphorylation of 9 kDa photosystem II-associated protein and the inhibition of photosynthetic electron transport. *BBA*. 893, 259-266.
  - 30). Ragan, C.I., et al. 1986. in *Techniques for the analysis of membrane protein* Chapman and Hall, London, pp19-22.
  - 31). Ryrie,I.J.,et al. 1980. The role of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in chloroplast membrane stacking. *Eur.J.Biochem.* 107, 345-354.
  - 32). Steinback,K.E.,et al. 1982. Phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll-protein regulates excitation energy distribution between photosystem II and photosystem I. *Arch. Biochem.Biophys.*216, 356-361.
  - 33). Suss,K.H.,et al. 1980. Polypeptide composition and spectral properties of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes from intact and trypsin treated chloroplast thylakoid membranes.*BBA*.592,369-374.
  - 34). Tanaka,A.,Y.Tanaka and H.Tsuji. 1987. Resolution of chlorophyll a/b-protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis : Evidence for the heterogeneity of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes. *Plant.Cell. Physiol.*28, 1537-1545.
  - 35). Thornber,J.P. 1975. Chlorophyll-proteins : Light-harvesting and reaction center components of plants. *Ann.Rev.Plant.Physiol.*26, 127-158.
  - 36). Thornber,J.P.,et al. 1987. Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants. *Physiol.Plantarum*.71, 236-240.
  - 37). van Dorssen,R.J.,et al. 1987. Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47 kDa chlorophyll protein of photosystem II. *BBA* 893, 267-274