

## 光波長에 따른 *Anabaena variabilis*의 Phycobiliprotein 含量 및 FNR 活性度 變化

金正晝·張楠基

서울대학교 師範大學 生物教育科

## Changes of PBP Quantity and FNR Activity by Light Wavelengths in *Anabaena variabilis*

Kim, Jung-Suk and Nam-Kee Chang

Dept. of Biology, College of Education, Seoul National University

### ABSTRACT

Changes of phycobiliproteins(PBP) quantity and ferredoxin-NADP reductase(FNR) activity were investigated in various light illuminated cyanobacteria, *Anabaena variabilis*. PBP components were increased under blue light illumination, whereas decreased under red light illumination. PBP contents were twofolds in blue light than in red light. In view of the PBP composition, allophycocyanin(APC) in red light was higher 5.5% and phycoerythrocyanin(PEC) in blue light was higher 2.2% than in white light-illuminated PBP. It was suggested that PBP changes in blue light be the results of regulation of photosynthetic efficiency and protection of photosystem, whereas PBP changes in red light be effected by adaptation of adequate harvesting of light energy in photosystem.

Changes of FNR activity were highest in red light, and sequenced lower to blue light and green light. It means that light-dependent production rate of  $\text{NADPH}_2$  is the highest in red light. The difference of  $V_{\max}$  values was larger than that of  $K_m$  values in comparison of red and blue light. It was suggested that increasing of FNR activity be due not to the function of isozyme, but to the synthesis of enzymes. Because of  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}_2$  regulation-effect to metabolism, it was considered that FNR activity might influence the metabolism indirectly and explain the probability of regulation in pathways of key enzyme activation. FNR activity was directly proportional to intensity of light. Optimum temperature and pH were about  $25^\circ\text{C}$  and 7.5, respectively.

### 緒 論

광합성 과정은 광의 흡수에 의해서 처음으로 시작되며, cyanobacteria와 홍조류에서 광의

흡수는 광수용체인 phycobiliprotein(PBP)에 의해 수행된다고 알려져 있다(Bogorad, 1975). Cyanobacteria의 광흡수 과정에서 엽록소 a는 중요한 반응 중심 색소로서 그 기능을 수행하나, 식물과는 달리 엽록소 b는 존재하지 않는다(Parson, 1982). 그리고 antenna 복합체의 색소들은 그 성질에 따라 매우 다양하게 나타난다(Glazer, 1982).

Phycobilisome은 cyanobacteria와 홍조류의 광합성 기구에 있어서 여러 종류의 단백질 복합체(6~8,000 KD)로 구성되어 있는 주요 광수용체로서, 세포내의 thylakoid 바깥 표면에 위치하고 있다(Giddings *et al.*, 1983). Phycobilisome은 PBP라는 여러 종류의 소단위로 구성되어 있는데, 이는 종에 따라 그 종류가 다양하며 *Anabaena variabilis*에서는 phycocyanin(PC), phycoerythrocyanin(PEC), allophycocyanin(APC)의 3종류로 구성되어 있다(Glazer *et al.*, 1971; Bryant *et al.*, 1976). 이러한 PBP는 색깔을 나타내는 여러 종류의 bilin들과 결합되어 있으며, phycobilisome단위당 300~700bilin들을 가지고 있다. PBP는 450~650nm의 범위내에서의 가시광을 흡수하여 PS II의 단백질-엽록소 복합체로 그 에너지를 이동시킨다(Fay *et al.*, 1987).

그리고 PBP에서 총 광의 수확능력 정도는 30~50%를 차지하고 있다. 각각의 PBP는 수용성이며, phycobilisome을 구성할 때, 그 구성적인 조성비율과 조성형식에 있어서도 각 종마다 다른 모양을 나타내고 있다. 이러한 광수용체로서의 PBP는 각 종류마다 흡수하는 광 파장이 각각 다르므로 이에 대한 광수용의 상호적인 에너지 전달 순서가 존재하는데, *Anabaena variabilis*에서는 PEC--→PC--→APC로 에너지 흐름이 일어난다(Lu *et al.*, 1984). 그리고 이러한 색깔을 띠는 PBP들은 색깔을 띠지 않는 여러가지의 결합 단백질(linker proteins)에 의해 서로 결합되어 있으며, 이러한 결합단백질은 phycobilisome을 구성하는 데 큰 영향을 미친다(Gingrich *et al.*, 1982). 돌연변이체의 연구에서 이러한 결합 단백질의 결핍은 각 PBP의 구성요소들이 서로 결합하는 데 방해를 하는 것으로 알려져 있다(Zilinskas *et al.*, 1983).

이러한 PBP의 구성은 주위의 광 변화에 따라 그 함량이 달라진다(Bennet *et al.*, 1973). 즉, 광 수용에 있어서 효율적으로 에너지를 전달하는 과정은 환경에 대한 일종의 적응으로서 그 합성양상이 달라질 수 있다. 이 과정에 대한 조절 기작은 여러가지 이론으로 설명되고 있으나, 아직까지 완전히 정립되지는 않았다. 이에 대한 설명으로서 adaptochrome의 광인식(Haury *et al.*, 1977)에 의한 변화 및 cryptochrome이나 phytochrome의 직접적인 조절작용(Dring, 1988)과 ALA synthetase의 합성 및 PBP중에서 apoprotein(i.e. APC)의 직접적 합성조절(Lemasson *et al.*, 1973; Ohad *et al.*, 1980)이 있으나, 그 유전자의 발현 단계에서의 조절도 전자수준(Gendel *et al.*, 1979; Conley *et al.*, 1985)에서 일어나는지, 아니면 번역수준(Belknap *et al.*, 1987)에서 일어나는지는 아직 확실치 않다.

Bogorad(1975)이후, 이러한 광에 대한 적응연구가 이루어지고 있으나, 아직도 조절에 관한 확실한 정설은 없다. 특히 *Anabaena variabilis*에서는 그 구조적 불확실성(Glazer, 1982) 때문에 많은 실험적 연구가 이루어지지 않은 실정이다. 그리고 빛의 파장 변화에 따른 PBP의 변화는 에너지 전달이라는 측면에서도 그 변화가 수반된다고 할 수 있다. 이러한 광합성 기구의 구성성분에 대한 함량적 변화에 있어서 직접적인 에너지 효율에 대한 연구가 지금까지는 잘 알려져 있지 않다.

FNR(ferredoxin-NADP reductase; EC 1.18.1.2)은 엽록체나 광합성 세균에서 광합성을 하는 막의 전자전달계의 끝에 존재하는 flavoenzyme으로서, 광합성 기구에서 생성된 환원력

의 평형을 위한  $\text{NADPH}_2$ 의 생성에 관여하는 효소이다. 또한 이는 diaphorase와 ferredoxin-dependent cytochrome c reductase activity를 나타낸다(Pietro, 1972). FNR은 처음에 시금치에서 분리되었으며, 이는 종에 따라 다양한 isozyme을 가지고 있고(Fay *et al.*, 1987), Masaki *et al.* (1979)등은 *Spirulina platensis*에서 두 종류의 FNR을 발견하였으며 분자량은 35,000정도이다.

그리고 Nakamura *et al.* (1971)등은 ferredoxin reductase나 ferredoxin system에서는 낮은 ionic strength보다는 high ionic strength가 보다 효율적이라는 것을 발견하였으며, 이러한 ionic strength가 효소의 활성을 조절한다고 제안하였다. 또한 Rowell *et al.* (1981)은 빛에 의해서 FNR의 구조적 변화가 일어나며, 여기서의 상호전환은 light-effect-mediator나 thioredoxin system에 의한 것이라고 하였다.

질소 고정을 하는 광합성 생물에서 이 효소의 연구는 중요하며, PSI에서 pyridine nucleotide pool으로의 전자 전달에 관한 조절에 대해서는 거의 알려진 바가 없고, 여기서 FNR의 역할도 분명하지 않다. 지금까지는 FNR의 활성변화에 있어서 광량에 의한 연구가 대부분이었다. 이러한 문제해결에 접근하기 위해서는 고등식물보다는 cyanobacteria가 구조적으로 단순하여 보다 쉬운 재료로 선택된다. 특히 *Anabaena variabilis*는 광합성과 질소고정을 함께 수행하므로 좋은 재료가 될 수 있다.

광합성 생물은 광조건에서 FNR의 작용에 의하여 PPP경로에 의존한 환원력( $\text{NADPH}_2$ )의 생산보다는 광에 의한 환원력의 생산을 더욱 더 촉진시켜 물질 합성에 이용하고 있다(Sancho *et al.*, 1988). 이러한 FNR의 작용은 자가영양 생물에게는 매우 큰 비중을 띤 작용을 하며, 이러한 환원력은 또한 성장과도 밀접한 관계를 지닌다(Pietro, 1972).

따라서, 본 연구에서는 cyanobacteria인 *Anabaena variabilis*를 재료로 하여, 광의 파장에 따른 광수용 단백질인 PBPs의 함량 변화와 이에 따른 FNR의 활성 변화 및 특성을 조사하였다.

## 材料 및 方法

### Strain 및 배양조건

*Anabaena variabilis*를 BG-11 배지로 배양시켰으며, 온도는 28~30°C로 조절하였고, 광 조건은 6,000 lux로 일정하게 하였다.

### 광 조건의 변화

광원은 halogen lamp를 사용하였으며, 출력 조절기를 이용하여 광의 세기를 조절하였다. 각 filter의 spectrum은 직접 spectrophotometer(Varian, Cary17-D)를 이용하여 scanning한 다음(Fig. 1), 이를 이용하여 각각의 파장에 따른 광의 변화를 조절하였다.

### Phycobillsome의 분리

분리는 Gantt *et al.* (1979)의 방법에 따라서 수행하였다. 세포를 Sorvall centrifuge로 4,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 수확하였다. 이를 1mM EDTA, 1mM PMSF를 포함하는 0.75M  $\text{K}^+$ -phosphate buffer(pH 6.8~7.0)로 2회 정도 세척한 뒤, 다시 원심분리하여 수확된 세포와 동일한 부피의 위 buffer를 가한 후 10~20초 간격으로 8분 동안 sonication한 다

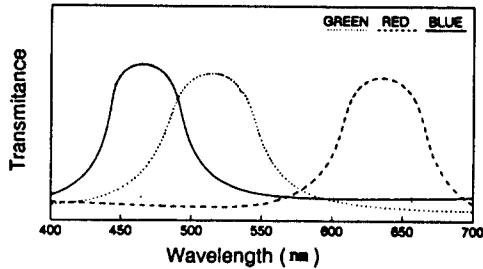


Fig. 1. Transmittance spectrum of filters.

음, 이를 detergent인 triton X-100을 처리하여 3분 정도 stirring한 후 20분 동안 incubation 시켰다. 이 때, triton X-100의 농도는 최종농도가 2%가 넘지 않도록 조정하였다. 이를, 다시 12,000rpm으로 원심분리한 다음, 상층액을 취하여 준비하였다. 위 모든 과정은 4°C이하에서 수행하였다.

#### 전기영동에 의한 phycobilliprotein의 분리

PBP의 분리는 준비된 시료에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 최종농도를 65%로 하여 침전시킨 다음, 4°C에서 24시간 방치한 후 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이를 5mM  $\text{K}^+$ -phosphate buffer(pH 7.0)으로 세척한 후, 투석시켜 loading sample을 마련하였다. Gel은 14% polyacrylamide gel을 사용하여, Gringrich *et al.* (1982)의 방법에 따라 단백질을 분리하였다.

#### Phycobilliprotein의 정량

PBP의 정량은 Bennett *et al.* (1973)의 방법에 따라 수행하였다. 각 PBP의 구성요소들이 광의 흡수정도가 종류별로 다른 성질을 이용하여 spectrophotometer(Varian, DMS)로서 측정하였다. 이에 대한 정량식은 다음과 같다.

$$\text{PEC} = 0.00499A_{650} - 0.0638A_{620} + 0.129A_{573}$$

$$\text{PC} = -0.0922A_{650} + 0.181A_{620} - 0.0291A_{573}$$

$$\text{APC} = 0.160A_{650} - 0.0423A_{620} + 0.00258A_{573}$$

(concentration=mg/ml)

#### FNR Enzyme Assay

##### 시료의 준비

시료의 준비는 Masaki *et al.* (1979)와 Carrillo *et al.* (1980)의 방법을 변형하여 수행하였다. cell을 4,000rpm에서 5분 정도 원심분리하여 수확한 뒤, 1mM EDTA, 50mM Hepes buffer (pH 8.0)로 2번 세척한 다음, sonication을 10~20초 간격으로 5분 정도 행하고, 12,000rpm으로 다시 원심분리를 30분 동안 한 다음, membrane-depleted 상층액을 취하여 시료로 사용하였다. 위 모든 과정은 4°C이하에서 수행하였다.

##### Enzyme Assay

효소 분석은 Masaki *et al.* (1979)와 Carrillo *et al.* (1980)의 방법에 따라, 광의 세기 및 파장 변화에 따른 photo-activation activity를 측정하였다. 반응용액으로는 50mM Hepes-NaOH buffer pH 8.0, 10mM ascorbate, 2mM  $\text{NADP}^+$ 을 사용하였으며 전자 공영체로서는 50 $\mu\text{M}$  DCIP을 사용하였다.

반응은 항온 수온 조절기(HAAKE W13)를 이용하여 25°C에서 반응용액 1ml에 시료 1ml을

가한 후, 광(8,000lux)을 조사시킴으로써 시작하였다. 3분후, 2N NaOH 50  $\mu$ l를 가하여 반응을 중지시켰다. 여기에 300mM Tris-HCl(pH 8.0), acetic acid 3000  $\mu$ l를 가한 후, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리시킨 다음, A<sub>340</sub>에서 측정하였다. 후에 3  $\mu$ g PMS를 가하여 측정된 A<sub>340</sub>값을 background로 삼았다. Control은 광을 가하지 않은 시료로 하여 값을 보정하였다.

**단백질 정량**

각 시료의 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 하여 Lowry *et al.* (1951)에 따라서 A<sub>540</sub>에서 측정하였다.

**結 果**

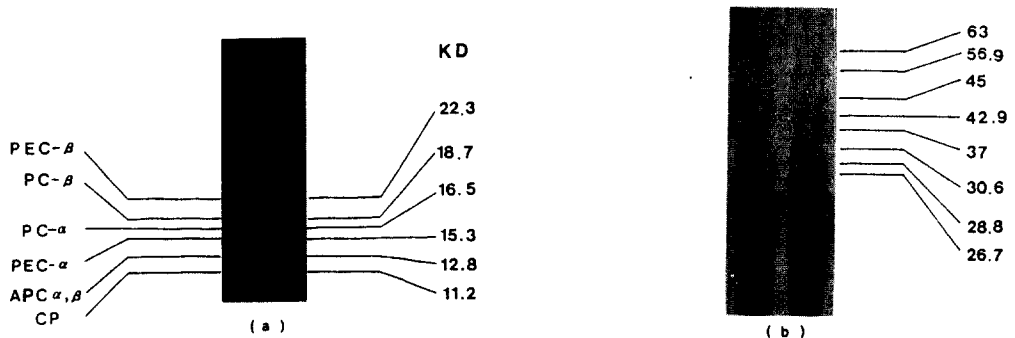
**Phycobiliprotein의 SDS-PAGE에 의한 분리**

일반적으로 phycobiliprotein은 분자량이 작으므로(15~25 KD), 높은 gel함유량을 필요로 하여 그 sieve를 작게 할 필요가 있다. 본 실험에서는 14% SDS-PAGE를 사용하여 분리하였다. Fig. 2(a)는 시료의 단백질이 염색되지 않은 상태에서 PBPs는 색깔을 띠고 있다. 여기서 6개의 색소 band가 나타났다.

Bryant *et al.* (1976)과 Gingrich *et al.* (1982)의 보고와 비교하여 볼 때, 22.3 KD는 PEC  $\beta$ -subunit, 18.7 KD는 PC  $\beta$ -subunit, 16.5 KD는 PC  $\alpha$ , 그리고 15.3 KD는 PEC- $\alpha$ , 12.8 KD는 APC  $\alpha$ - $\beta$ -subunit로 밝혀졌다.

특이한 것은 녹색 band 1개가(11.2 KD)밑에서 나타났는데, 이는 분리시 PBP와 가까이 결합하고 있는 PSII의 단백질-엽록소 복합체 또는 free pigment로 생각된다.

Fig. 2(b)는 gel을 coomassie blue로 단백질을 염색하여 보여주고 있다. 여기서 Fig. 1에서 보이지 않는 여러가지 결합단백질이 나타나며, gel상에서는 8개의 band로 분리되었다. 26.7 KD는 PC-linker로서 중요한 역할을 하며 28.8, 30.6 KD 그리고 37 KD는 PEC, APC



**Fig. 2.** Separation of the polypeptide of *A. variabilis* phycobilisomes by 14% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.  
 (a) Unstained polypeptides of dissociated phycobilisomes.  
 (b) Coomassie blue-stained polypeptides of phycobilisomes.

의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 45 KD는 다른 종에서와 같이 그 위치가 아직 밝혀져 있지 않으나 PBP의 연결에는 관여하는 것 같으며(Zilinskas *et al.*, 1983; Gingrich *et al.*, 1982), *Anabaena variabilis*에서는 다른 종에는 보이지 않는 42.9, 56.9 그리고 63 KD 정도의 단백질이 나타났다.

### 빛의 파장변화에 따른 PBP의 함량변화

Fig. 3에서는 적색광으로서 조사시켰을 때, *Anabaena variabilis*의 PBP의 각 구성요소의 변화를 시간에 따라 측정하였다. 처음 빛을 비추어 준 12시간까지는 PC의 급격한 감소를 보여주고 있으며, 그 후에는 시간이 지남에 따라 어느 정도 일정한 양으로 존재하는 적응양상을 보여주고 있다.

Fig. 4는 청색광하에서 PBP가 시간이 지남에 따라 전체적으로 증가하는 양상을 보여주었다. 즉, 청색광하에서는 PBP의 합성이 증가하여 적응할 수 있는 상태를 나타낸다.

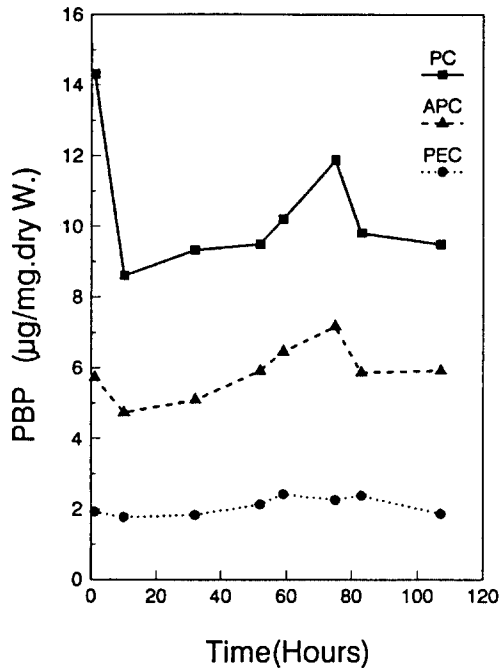


Fig. 3. Changes of PBP components in RED light-illuminated *A. variabilis*.

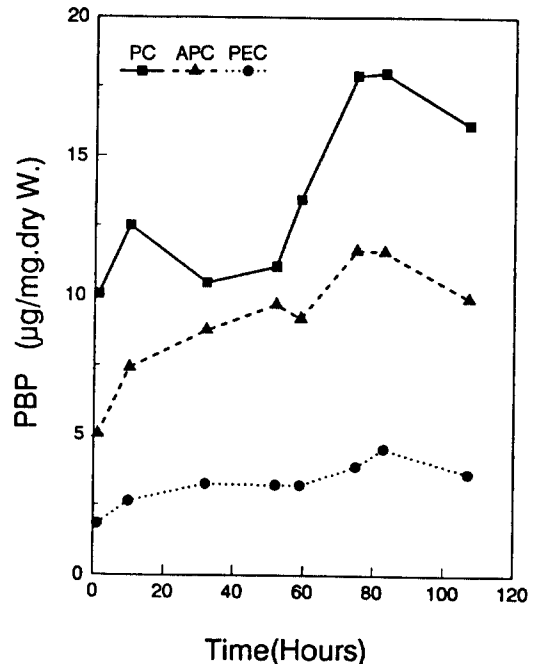


Fig. 4. Changes of PBP components in BLUE light illuminated *A. variabilis*.

그러나 여기서 적색과 청색광하에서의 PBP 구성요소들의 비율을 볼 때, *Anabaena variabilis*에서는 PC가 제일 많았고, 다음으로 APC, PEC의 순으로 나타나는 공통성을 볼 수 있었다 (Fig. 5). 이는 다른 종에서와는 다른 차이를 보여주는 특징이다(Bryant, 1981). 즉, 이는 PEC의 특징적 관계라고 할 수 있다. 특히 다른 PE 구성요소를 함유하고 있는 종과의 두드러진 적응 양상의 차이를 보여준다. 빛에 대한 PBP의 구성율에서의 차이를 비교하면 백색광에 비해 상대적으로 청색광에서는 PEC의 비율이 2.2%정도 높으며, 적색광에서는 APC가 5.5%정도로 증가된 비율로 나타나고 있다.

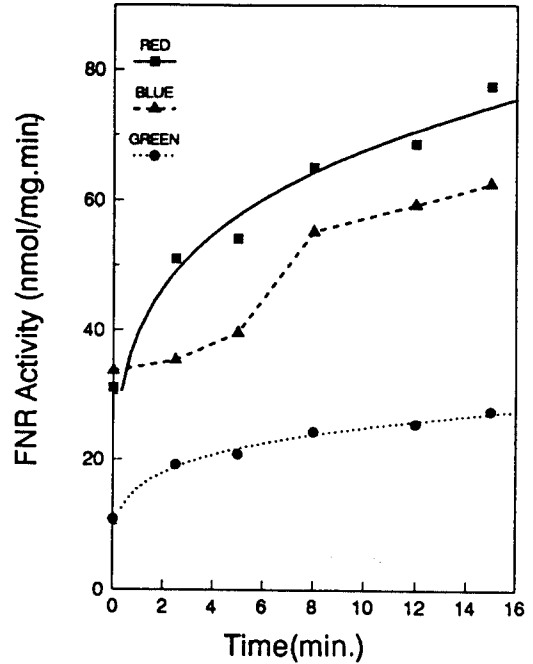
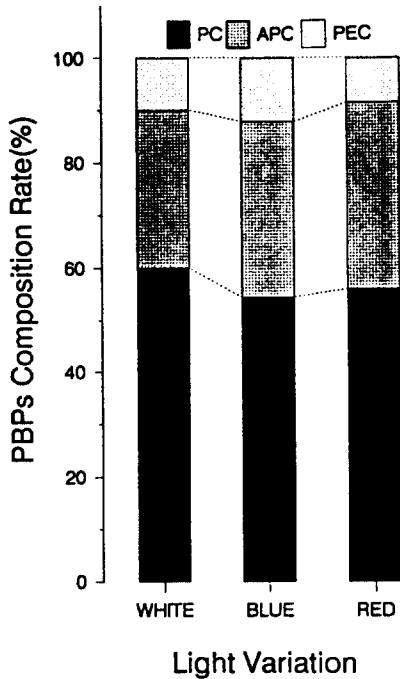


Fig. 5. Histogram of PBP composition rate in various light-illuminated *A. variabilis*.

Fig. 6. Effects of light wavelengths in FNR activity of *A. variabilis*.

**FNR의 활성도 변화**

**빛의 파장 변화에 따른 FNR 활성도 변화**

Fig. 6은 시간에 따른 FNR의 활성을 나타내었다. 시간이 증가함에 따라 활성도의 크기는 증가하였으며, 동일 온도(25℃), 동일 반응 시간(min.)내에서는 적색>청색>녹색광의 광조건 순으로 나타났다. 여기서, 녹색광 하에서의 효소활성은 다른 광조건보다 매우 작게 나타났다.

**빛의 세기에 따른 FNR의 활성도 변화**

Fig. 7에서 효소활성은 일정한 시간, 온도에서 광의 조사량이 크면 클수록 증가하는 양상으로 나타난다. 이러한 활성도의 증가는 광세기와 일차적인 비례양상을 띠는 것으로 나타났다.

**pH의 변화에 따른 FNR의 활성도 변화**

일정한 광조건하에서 pH를 여러가지로 달리하여 주었을 때, 그에 따른 FNR의 활성변화를 측정하였다(Fig. 8). 최적 활성은 pH 7.5정도에서 나타났으며, 전반적으로 알칼리성이 산성보다 큰 효소활성을 보이며, pH 5이하에서는 급격한 감소현상을 보이고 있다.

**온도에 따른 FNR의 활성도 변화**

일정한 광조건하에서 온도를 달리하여 효소활성을 조사하였다(Fig. 9). 효소활성은 25℃ 정도에서 최적상태를 보였으며, 20℃이하나 30℃이하에서는 활성이 급격히 감소하였다.

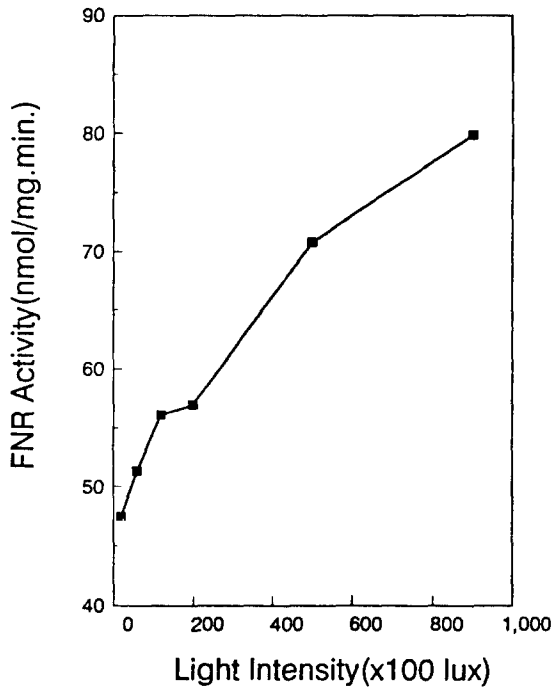


Fig. 7. Effects of light intensity in FNR activity of *A. variabilis*.

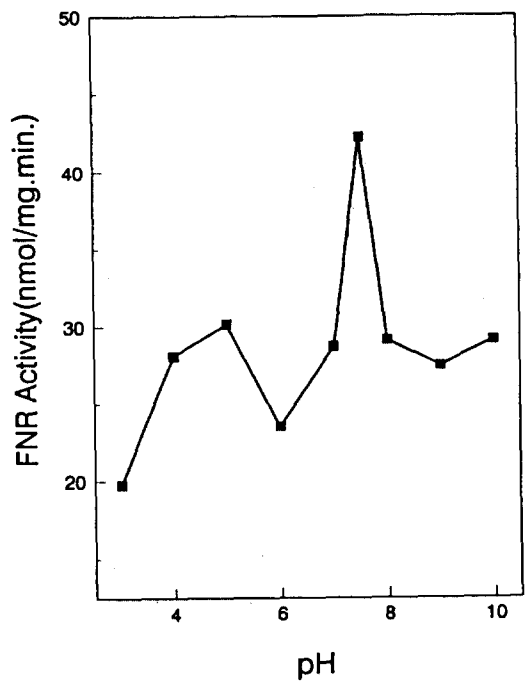


Fig. 8. Effect of pH on the dependence of FNR activity in *A. variabilis*.

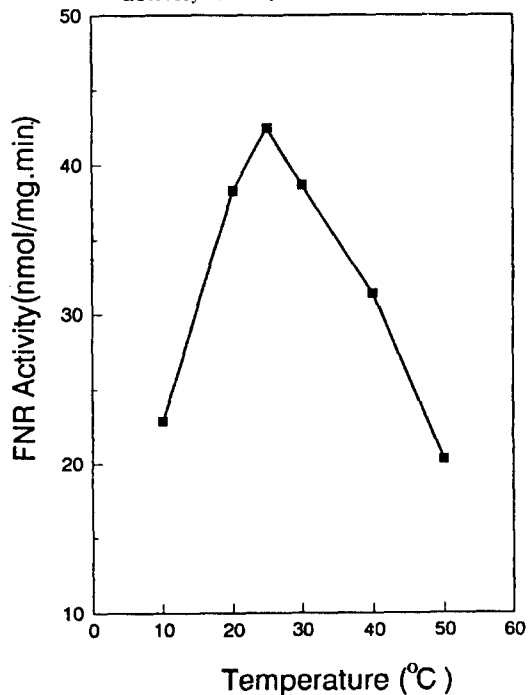


Fig. 9. Effects of temperature on the dependence of FNR activity in *A. variabilis*.

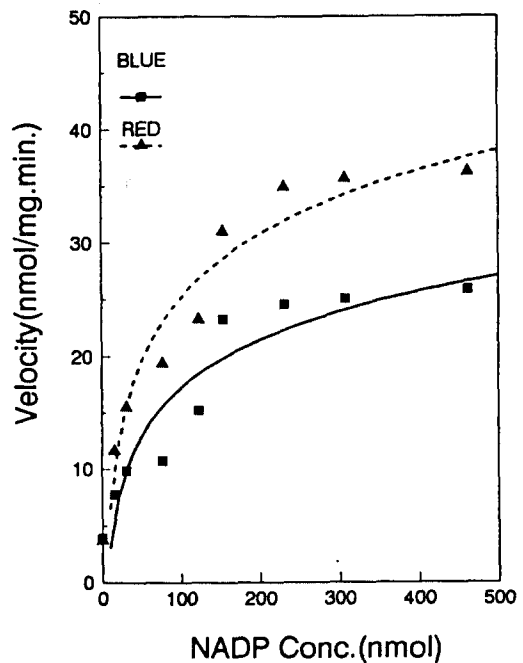


Fig. 10. The plot of illuminated FNR activity on the increasing NADP concentration.



기질에 대한  $K_m$ ,  $V_{max}$ 의 결정

일정한 광조건하에서 NADP에 대한 기질변화량에 대한 효소활성을 측정하였다(Fig. 10, Fig. 11).  $V_{max}$ 와  $K_m$ 값의 결정은 Lineweaver-Burk plot으로 적색광에서는  $5.2 \times 10^{-2} \mu\text{mol NADPH}_2$ 와  $0.11 \mu\text{M}$ , 청색광에서는  $2.4 \times 10^{-2} \mu\text{mol NADPH}_2$ 와  $0.09 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 기질이 350nmol이상일 때에는 기질억제 현상이 나타났다.

### 論 議

*Anabaena variabilis*의 PBP가 전기영동에 의하여 분리되었다. 이 종에서는 PBPs로서 구성되어 있는 phycobilisome의 구성양상이 PEC의 결합방식이 종 자체내에서도 매우 다양하게 나타나기 때문에, 다른 규칙적인 phycobilisome의 구성요소를 띠는 cyanobacteria와는 다른 상태를 가진다(Glazer, 1982).

본 연구에서는 여러 종류의 phycobiliprotein들이 염색되지 않은 상태에서 분리되었으며,

이는 다른 종(Siegelman *et al.*, 1982)에서와는 약간 다른 분자량을 나타내고 있다. 그리고, coomassie blue로 다시 단백질을 염색하여 살펴본 결과, 여러가지의 결합 단백질들이 나타났으며, 이도 약간의 분자량 차이를 보이나 이는 SDS-PAGE에 의한 차이라고 볼 때, 전체적으로 다른 종과 비슷한 양상을 띠며 나타났다(Takahiro *et al.*, 1987).

특이한 것은 대체적으로 분자량이 큰 단백질-엽록소 복합체들은 PBP분리시 제거되었으나, 매우 작은 단백질-엽록소 복합체로서 1개의 band(11.2 KD)가 같이 분리되어졌는데, 이는 2가지로 설명이 가능하다.

첫째는, Khanna *et al.* (1983)의 연구 보고에서와 같이 PBP가 SPII system과 매우 근접한 위치를 가지며, 에너지의 전달에서도 매우 밀접한 관계를 지니기 때문에 이는 바로 PBP와 결합하고 있는 PSII 구성성분이라고 추정되며,

둘째는, Rusckowski *et al.* (1980)의 결과와 같이 일종의 free pigment일 수도 있다. 그러나 단백질 band가 뚜렷하게 나타난 것으로 볼 때, free pigment로 생각되기에는 어렵다. 그리고 실험에서 새로이 나타난 42.9, 56.9, 63 KD정도의 단백질의 위치와 기능은 아직 밝혀져 있지 않지만, PBP의 구조의 다양성과 관계가 있으며 PEC의 연결과 관련이 있다고 생각된다. 여기에는 상세한 연구가 더 있어야 할 것이다.

Gingrich *et al.* (1982)의 보고에 의하면, cyanobacteria중 PEC대신 PE를 함유한 많은 종들의 실험에서, 청색광에서는 PC와 적색광에서는 PE의 합성이 증가한다고 하였다. 본 연구에서 적색광하에서의 *Anabaena variabilis*는 초기적응 상태로서 PBP의 구성요소량의 큰 변화를 일

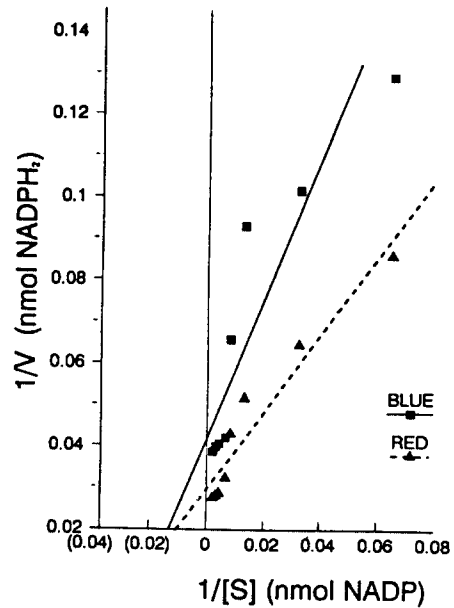


Fig. 11. The Lineweaver-Burk plots of illuminated FNR velocity versus NADP concentration.

으켰고 이는 한 특별한 구성요소량의 증가(Bryant, 1981)가 아닌 전체적인 양에서의 감소하는 추세를 보였다. 단지, 그 구성율에 있어서, 상대적으로 낮은 에너지 수용체이고 그 에너지를 단백질-엽록소 복합체로 전달하는 데 관여하는 APC의 상대적 비율이 크게 나타났다. 이는 빛의 광합성에 대한 매우 적합한 에너지로서의 광세기가 들어 오므로 이에 대한 적응양상으로의 단백질 합성 조절로 추정되며, 그 광합성 효율면에서 볼 때, PBP의 전체적인 양의 감소라도 효율이 낮아지지만 않는다면 매우 알맞은 에너지 평형을 가질 것이다.

반면에 청색광하에서 초기에는 변화가 없으나, 60시간 이후에는 PBP의 전 구성요소가 함께 증가하는 경향을 보였으며, 특히, 단파장을 흡수하는 PEC의 구성비율이 다른 구성요소에 비해 더욱 증가한 경향을 보였다. 이는 빛의 파장이 짧은 환경에 대한 광합성 기구의 보호측면과 에너지 효율측면으로서 이해되며, 다른 종에서의 실험과 같이 빛의 각각 다른 파장에 대한 한 구성성분만의 합성증가라는 양상(Tandeau *et al.*, 1980)과는 다른 결과를 보여주었다. 이는 *Anabaena variabilis*에서의 다양한 phycobilisome의 구성 양상, 특히 PEC결합방식의 다양성으로 인한 영향이 크다고 생각되나 여기에 대한 좀 더 분석적인 연구가 필요하며, 빛의 환경변화에 대한 적응양상의 조절적인 차이도 함께 고려되어야 할 것이다. 결론적으로, 빛의 파장변화는 *Anabaena variabilis*에 있어서 PBP의 합량적 변화를 일으키며, 그 구성비율면에서도 다르게 나타났다.

광합성에 있어서 여러 주요 효소들의 광활성화에 대한 연구가 있어 왔다. 광에 의한 조절은 고등식물에서 전사단계에서의 조절이 phytochrome의 광반응에 의해 이루어지며(Kuhlemeier *et al.*, 1987), 여러 효소들 중에서 특히 RUBPase(Fluhr *et al.*, 1986)와 nitrate reductase(Sanchez *et al.*, 1990)에 대한 연구가 많이 진행되었고, 또한 여러 주요 효소들은 청색 광에 의해 활성도가 증가한다는 보고가 있다(Buchanan, 1980). 효소의 광활성화에 관한 연구는 엽록체내에서 Effector(ATP, NADPH<sub>2</sub>)의 중개에 의한 것과 이온(Mg<sup>2+</sup>)의 중개에 의한 것, 그리고 단백질(ARP<sub>a</sub>, ARP<sub>b</sub>)의 중개에 의한 것으로 그 기작을 설명하고 있다(Buchanan, 1980).

본 실험에서는 *Anabaena variabilis*에서의 FNR효소의 광에 대한 특성을 조사하였다. 지금까지 이러한 효소활성도는 광세기의 차이에 의한 연구가 되어 왔다. 이 중에 있어서 FNR의 효소특성은 다른 고등식물이나 조류에서와 마찬가지로 비슷한 양상을 띠고 있다. 적정 온도는 25℃ 정도로 나타났으며 최적 pH는 7.5정도를 보여주고 있어 이는 다른 종과 유사한 특성(Carrillo *et al.*, 1980)을 나타내었으며, 광량의 변화에 대한 활성도 증가도 같았다. 그러나 본 연구에서 빛의 파장변화에 따른 FNR의 활성도 변화 차이는 다른 광합성의 주요 효소들과는 달리 적색광에서 가장 높은 활성도를 나타내었고 청색광, 녹색광의 순서로 나타났다. 이는 광합성의 효율면에서 볼 때, 그 NADPH<sub>2</sub>의 생성율은 적색광 하에서 가장 높다는 것을 의미한다. 그리고 적색광과 청색광에서 K<sub>m</sub>과 V<sub>max</sub>의 값을 비교해 볼 때, V<sub>max</sub>의 값의 변화가 K<sub>m</sub>의 값 변화보다 큰 것을 알 수 있다. 즉, 이는 isozyme의 기능으로서가 아닌 FNR의 합성에 의한 증가 효과가 더 크다고 볼 수 있다.

여러가지 물질대사의 관계에서 조절요소로 작용하는 NADP/NADPH<sub>2</sub>의 기능에서 볼 때, 여러가지로 조절을 분해와 합성경로에서 제한할 수 있다. 청색광 하에서는 탄수화물의 분해와 NR활성도의 증가, 단백질 합성율의 증가(Senger, 1980)를 볼 수 있는데, 이는 앞에서 청색광의 RUBPase활성증가라는 면에서 탄수화물의 합성경로를 따르는 것이 아닌 일종의 α

-ketoglutarate의 생성으로 귀납된다. 즉, Calvin cycle의 DPGA에서 G3P로 환원되는 경로에 있어서, 청색광의 반응 저해 효과는 FNR의 상대적인 활성이 감소하는데 따른 NADPH<sub>2</sub>의 생성을 저하와 단백질의 합성 증가에 의한 것으로 사료된다. 따라서 이 경로로의 저해작용에 의해 3PGA는 PEP로 산화 되어 PEP carboxylase의 작용에 의해 oxaloacetate가 되어 TCA 회로로 들어가  $\alpha$ -ketoglutarate의 합성율을 증가시키며, 이는 NR의 효소활동에 의해 질소원의 유입을 증가시키는 것으로 생각된다. 이러한 이동경로중 NADPH<sub>2</sub>의 결핍은 조절작용에서 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 대사작용이 FNR과의 활성변화와 직접적인 관계는 아니지만 NADPH<sub>2</sub>의 조절면에서 볼 때, 간접적으로 영향을 끼칠 것이다. 그러나 이에 대한 직접적인 증거는 없으므로 앞으로 더 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 要 約

Cyanobacteria인 *Anabaena variabilis*에서 광의 파장에 따른 phycobiliprotein의 함량과 ferredoxin-NADP reductase(FNR)의 활성도 변화를 조사하였다. 청색광에서 phycobiliprotein의 성분들은 증가하였으며 적색광에서는 감소하였다. Phycobiliprotein(PBP)의 생성량은 적색광보다 청색광에서 약 2배 정도 크게 나타났다. 구성면에서 볼 때, 백색광에 비하여 적색광에서는 allophycocyanin(APC), 청색광에서는 phycoerythrocyanin(PEC)의 구성비율이 각각 5.5%, 2.2%정도로 증가하였다. 이는 청색광에서 광합성 효율의 조절과 광기구의 보호 기능으로 인한 것이며, 적색광에서 광계의 적합한 에너지 수확에 의한 적응효과라고 사료된다.

FNR의 광의 파장에 따른 활성도 변화는 적색광에서 가장 크며 청색광, 녹색광의 순서로 나타났다. 이는 광을 이용한 환원력(NADPH<sub>2</sub>)의 생성율이 적색광에서 가장 크다는 것을 의미한다. 그리고 광의 파장에 따른 FNR의 V<sub>max</sub>치의 차이가 K<sub>m</sub>의 차이보다 크게 나타나므로 이는 isozyme에 의한 기능보다는 합성에 의한 활성도 증가의 가능성이 크다고 사료된다. 대사작용이 NADP/NADPH<sub>2</sub>의 조절작용을 받는다고 볼 때, FNR의 활성도가 간접적으로 영향을 끼칠 수 있으며, 따라서 여러 주요 효소들의 활성화에 대한 반응경로를 조절 가능할 것으로 생각된다. FNR은 광도의 세기에 따라 일차적인 비례관계로 활성도가 증가하였으며, 최적 온도는 25°C, 최적 pH는 7.5정도로 나타났다.

## 引 用 文 獻

- Belknap, W. R. and R. Haselkorn. 1987. Cloning and light regulation of expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* 4, 871-884.
- Bennett, A., L. Bogorad. 1973. complementary Chromatic adaptation in a filamentous Blue-Green Alga. *J. Cell Biol.* 58, 419-435.
- Bogorad, L. 1975. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann. Res. Plant Physiol.* 26 : 369-401.
- Bryant, D. A., A. N. Glazer, F. A. Eliserling. 1976. Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Arch. Microbiol.* 110, 61-75.

- Bryant, D.A. 1981. The photoregulated expression of multiple phycocyanin species. *Eur. J. Biochem.* 119, 425-429.
- Buchanan, B.B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31 : 341-374.
- Carrillo, N., H.A. Lucero, R.H. Vallejos. 1980. Effect of light on chemical modification of chloroplast ferredoxin-NADP reductase. *Plant Physiol.* 65, 495-498.
- Conley, P.B., P.G. Lemaux, A.R. Grossman. 1985. Cyanobacterial light-harvesting complex subunits encodes in two red light-induced transcripts. *Science.* 230, 550-553.
- Dring, M.J. 1988. Photocontrol of developmental in algae. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 : 157-174.
- Fay, P., C. Van Ballen. *The Cyanobacteria.* Elsevier. 1987.
- Fluhr, R., N.H. Chua. 1986. Developmental regulation of two genes encoding ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic petunia plants : Phytochrome response and blue-light induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 2358-2362.
- Gantt, E., C.A. Lipschultz, J. Grabowski, B.K. Zimmerman. 1979. Phycobilisomes from Blue-Green and Red Algae. *Plant Physiol.* 63, 615-620.
- Gendel, S., I. Ohad, L. Bogorad. 1979. Control of phycoerythrin synthesis during chromatic adaptation. *Plant Physiol.* 64, 786-790.
- Giddings, T.H., J.C. Wasmann, L.A. Staehelin. 1983. Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiol.* 71, 409-419.
- Gingrich, J.C., L.K. Blaha, A.N. Glazer. 1982. Rod Structure in cyanobacterial phycobilisomes : Analysis of *synechocystis* 6701 mutants low in phycoerythrin. *J. Cell Biol.* 92, 261-268.
- Glazer, A.N., C.B. Germaine. 1971. Subunits structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68, 1398-1401.
- Glazer, A.N. 1982. Phycobilisomes : Structure and dynamics. *Ann. Rev. Microbiol.* 36 : 173-198.
- Haury, J.F., L. Bogorad. 1977. Action spectra for phycobiliprotein synthesis in a chromatically adapting cyanophyte, *Fremyella diplosiphon*. *Plant Physiol.* 60, 835-839.
- Khanna, R., J.R. Graham, J. Mayers, E. Gantt. 1983. Phycobilisome composition and relationship to reaction centers. *Ann. Biochem. Biophys.* 224, 534-542.
- Kuhlemeier, C., P.J. Green, N.H. Chua. 1987. Regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38 : 221-257.
- Lemasson, C., N. Tandeau, G. Cohen-Bazire. 1973. Role of allophycocyanin as a light-harvesting pigment in cyanobacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 3130-3133.
- Lowry, O.H. *et al.* 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol.*

- Chem. 193, 265-267.
- Lu Rong-Zhao and Yu Yan-Li. 1984. Spectral changes in fluorescence of phycobilisomes in the course of dissociation. *Photosyn.* 2 : 179-183.
- Masaki, R., K. Wada, H. Matsubara. 1979. Isolation and characterization of two ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from *Spirulina platensis*. *J. Biochem.* 86, 951-962.
- Nakamura, S., T. Kimura. 1971. Studies on spinach ferredoxin-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reductase. *J. of Biol. Chem.* 246, 6235-6241.
- Ohad, I., H.A.W. Schneider, S. Gendel, L. Bogorad. 1980. Light-induced changes in allophycocyanin. *Plant Physiol.* 65, 6-12.
- Parson, W.W. 1982. Photosynthetic Bacterial Reaction Centers. *Ann. REv. Biophys. Bioeng.* 11 : 57-80.
- Pietro, A.S. Photosynthesis and nitrogen fixation. *Methods in Enzymol.* Vol. 24. Academic Press, Inc. 1972.
- Rowell, P., J. Diez, S.K. Apte and W.D.P. Stewart. 1981. Molecular heterogeneity of ferredoxin : NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Acta.* 657, 507-516.
- Rusckowski, M., B.A. Zilinskas. 1980. Chlorophyll-protein complexes of the cyanophyte, *Nostoc* sp. *Plant Physiol.* 65, 392-396.
- Sanchez, J., H.W. Heldt. 1990. On the regulation of spinach nitrate reductase. *Plant Physiol.* 92, 684-689.
- Sancho, J., M.L. Peleato, C.G. Moreno and D.E. Edmondson. 1988. Purification and properties of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena variabilis*. *Arc. Biochem. Biophys.* 260, 200-207.
- Serger, H. 1980. *The Blue Light Syndrome*. Springer-Verlag.
- Siegelman, H.W., J.H. Kycia. 1982. Molecular morphology of cyanobacterial phycobilisomes. *Plant Physiol.* 70, 887-897.
- Takahiro, I., T. Katoh. 1987. Subparticles of *Anabaena* phycobilisomes : II. Molecular assembly of allophycocyanin cores in reference to "Anchor" protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 317-324.

(1991年 2月 7日 接受)