

TIB로 처리된 시금치의 엽록체에서 산소발생계의 광재활성화

鄭 華 淑 · 朴 康 殷
(慶北大學校 師範大學 生物教育科)

Photoreactivation of the Oxygen Evolving Center in TIB-treated Chloroplasts of Spinach

Chung, Hwa Sook and Kang Eun Park
(Department of Biology Education, Kyungpook National University, Taegu)

ABSTRACT

In Tris-*iso*-butanol (TIB; Tris buffer pH 8.8 and 1% *iso*-butanol)-treated chloroplasts, oxygen evolving activity was more inhibited than Tris-treated chloroplasts, but restored highly by 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) and photoreactivation. To understand the mechanism of this result of TIB in photosynthetic electron transport system, oxygen consumption and evolution of PS I and PS II were measured and protein of the chloroplasts was analysed. In Tris- and TIB-treated chloroplasts, oxygen evolving activity was increased according to the light intensity. Under $48 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ light intensity, the oxygen evolving activity in both chloroplasts were similar but as the light intensity was increased, TIB-treated chloroplasts showed higher activity. Under $240 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ light intensity, TIB-treated chloroplasts showed about 25% higher oxygen evolving activity than Tris-treated chloroplasts. Oxygen evolving activity was increased after photoreactivation in both Tris-treated and TIB-treated chloroplasts. Addition of NH_4Cl increased the activity in both chloroplasts but in TIB-treated chloroplasts the increase was 30% higher than that in Tris-treated chloroplasts. In PS I, oxygen evolving activity was not inhibited by both treatments whereas in PS II, significant difference was observed between two treatments. Addition of Mn^{2+} and Ca^{2+} enhanced oxygen evolution in both Tris- and TIB-treated chloroplasts. Though enhancement was higher in TIB-treated chloroplasts. No difference was observed in protein analysis of the two thylakoid membrane.

서 론

엽록체의 산소발생 활성은 열, pH, 화학물질 및 금속이온 처리에 의하여 억제되며(Jerry *et al.*, 1972; Atal *et al.*, 1991; Shen and Inoue, 1991; Shen and Katohs, 1991) 대부분의 경우 억제는 비가역적이다(Feierabend *et al.*, 1992). 그러나 Tris 처리에 의한 억제는 환원된 2,6-dichlorophenol-indophenol(DCPIP) 처리와 광조사에 의해 산소발생이 회복되며 광에 의한 재활성화 과정은 엽록체에 Mn^{2+} , Ca^{2+} 및 di-

thiothreitol(DTT)를 첨가한 후 광조사한다(Yamashita and Ashizawa, 1985). Tris 처리 과정에서 엽록체의 Mn^{2+} 함량은 원래 수준의 1/3로 감소한다고 보고되어 있다(Yamashita, 1982). Tris 처리한 엽록체의 산소발생 활성의 억제에 대한 기작은 산소발생계의 필수적인 망간 함량이 엽록체에서 감소한다는 보고(Yamashita and Ashizawa, 1983)와, 엽록체로부터 산소발생계의 Hill 반응을 촉진하는 peptide의 파괴 및 환원된 DCPIP 또는 hydroquinone과 같은 환원제가 있을 때 저해된 엽록체를 재활성화시킴으로 엽록체의 구성요소가 산화된다는 보고(Yamashita, 1982)가 있다. Yamashita와 Tomita(1974)는 Tris-acetone 처리한 엽록체에서도 망간, 칼슘, DTT 및 BSA가 있을 때 암처리된

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

엽록체에 광조사하여 재활성화를 증진시키는 데 성공하였으며 Tris-acetone 처리한 엽록체는 Tris 처리한 엽록체에 서보다 망간의 소실이 더 많았다고 보고하였다. 또한 Tris 처리한 후 DCPIPH₂를 처리하여 엽록체에 망간, 칼슘 및 DTT를 첨가하여 광조사하면 망간이 소실된 엽록체는 DC-PIPH₂ 처리와 광에 의한 재활성화 과정에 의해 망간의 축적이 일어난다고 보고되어 있다(Yamashita and Ashizawa, 1985).

본 연구에서는 TIB 처리한 엽록체가 Tris 처리한 엽록체보다 산소발생 활성이 억제되었지만 암소에서 20분간 DCPIPH₂ 처리한 후 망간과 칼슘 및 DTT를 첨가하여 약 광하에서 20분간 광에서 재활성화시켰을 때 산소발생 활성이 높게 나타났다. 그러므로 TIB 처리한 엽록체의 전자 전달계의 억제부위와 가역적인 광에 의한 재활성화 기작을 알아보기 위하여 광합성 전자 전달의 PS II와 PS I의 활성을 산소발생 및 소모량으로 측정하였으며, 또한 SDS-PAGE에 의하여 엽록체 단백질 폴리펩티드 양상의 차이를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 엽록체 추출. 시장에서 구입한 시금치(*Spinacia oleracea* L.)의 싱싱한 어린 잎을 골라 식물 재료로 사용하였다. 엽록체 추출은 Obokata(1987)의 방법을 변형하였으며, 냉각한 증류수로 세척한 시금치의 어린 잎 50g과 STN buffer(pH 8.0, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl) 140 mL와 1 M ascorbate-Na(Asc) 1.4 mL를 냉각시킨 blender에 넣어서 20초간 마쇄하여 2점의 가아제로 여과하였다. 이 여과액을 300g에서 1분간 원심분리하여 침전물은 버리고 상등액을 다시 600g에서 10분간 원심분리하여 침전물에 STN buffer(pH 7.8, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl) 40 mL를 분주하여 현탁한 후 1,000g에서 10분간 원심분리하였다. 모든 추출과정은 0~4°C에서 행하였다.

TIB 처리 및 광에 의한 재활성화. TIB 처리는 추출된 엽록체에 0.8 M Tris buffer(pH 8.8, 1% iso-butanol 포함) 10 mL를 첨가하여 0°C, 암소에서 2시간 처리한 후 600g에서 10분간 원심분리하여 STN buffer(pH 7.8, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl)로 현탁하였다. 이것을 TIB 엽록체라 하며 Tris 처리만 한 것을 Tris 엽록체라 한다. Tris 엽록체와 TIB 엽록체에 DCPIP 0.3 mM과 Asc 2 mM이 되도록 첨가하여 암소에서 20분간 처리한 후 1,300g에서 10분간 원심분리하여 STN buffer(pH 7.8, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl)로 재현탁하였다. 이것을 각각 (Tris)DCPIPH₂ 엽록체와 (TIB)DCPIPH₂ 엽록체로 명명하였다. 광재활성화 처리를 하기 위한 반응액은 50 mM

Hepes buffer에 15 μM Mn(CH₃COO)₂과 1 mM Ca(CH₃COO)₂ 및 0.5 mM DTT로 하며 50 μg Chl/mL가 되도록 엽록체를 첨가하여 약광(0.7 W·m⁻²)으로 20°C에서 20분간 두어 광에 의해 재활성화시켰다. iso-Butanol은 1%로 처리하였다.

전자전달 활성 측정. 광합성 전자전달 활성은 Clark형의 산소전극(Nedbal *et al.*, 1991)을 이용하여 25°C에서 300 W tungsten projector lamp로 240 W·m⁻²의 빛을 비추면서 산소 발생량이나 소모량을 측정하였으며 H₂O → ferricyanide(FeCN)로의 전자전달(PS I+PS II) 활성은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 2 mM NaCl)와 2 mM K₃[Fe(CN)₆], 0.05% BSA, 2 mM NH₄Cl 및 50 μg Chl/mL가 포함된 반응액으로 산소의 발생량을 측정하여 Hill 반응 활성으로 하였다. H₂O → plastoquinone(PQ)로의 전자전달(PS II) 활성은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 2 mM NaCl)와 0.5 mM p-phenylenediamine, 4 mM K₃[Fe(CN)₆], 0.05% BSA, 2 mM NH₄Cl 및 50 μg Chl/mL가 포함된 반응액으로 산소의 발생량을 측정하였다(Critchley, 1981). DCPIPH₂ → methyl-viologen(MV)로의 전자전달(PS I) 활성은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 20 mM NaCl)와 2 mM MV, 2 mM Na₃N, 1 μM [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] (DCMU), 0.1 mM DCPIP, 5 mM Asc, 2 mM NH₄Cl 및 10 μg Chl/mL가 포함된 반응액으로 산소 소모량을 측정하였으며, PQ → MV로의 전자전달(PS I) 활성은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 20 mM NaCl)와 2 mM MV, 2 mM Na₃N, 1 μM DCMU, 0.1 mM DCPIPH₂, 5 mM Asc, 0.2% Triton X-100 및 10 μg Chl/mL가 포함된 반응액으로 산소 소모량을 측정하였다(Fu and Gibbs, 1988). 이 때 엽록소 함량은 Arnon(1949)의 방법에 따라 80% acetone으로 652 nm에서 전체 엽록소 함량을 측정하였다.

SDS-PAGE에 의한 엽록체 단백질 polypeptide의 분리. 엽록체 단백질의 추출은 Mayfield와 Huff(1986)의 방법을 변형하였으며 TIB 처리된 엽록체를 암에 의한 재활성화 및 광에 의한 재활성화시킨 후 원심분리한 침전물에 0.0625 M Tris buffer[pH 6.8, 10%(v/v) glycerol, 5%(v/v) β-Mercaptoethanol, 2.3% SDS 포함] 0.5 mL를 첨가하여 현탁시킨 후 이 시료 0.1 mL를 취하여 80% acetone과 혼합한 것을 Arnon(1949)의 방법에 따라 엽록소 함량을 정량하고 현탁한 남은 시료에 엽록소 함량의 10배가 되도록 SDS를 첨가하여(SDS : Chl = 10 : 1) 10분간 가용화시킨 후 4°C, 4,000g에서 10분간 원심분리한 상정액을 엽록체 단백질 추출액으로 사용하였다. Gel은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 12% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였으며 전기영동은 10 mA로 암조건에서 12시간 한 후 0.2% coomassie brilliant blue R-250으로 상온에서 24시간

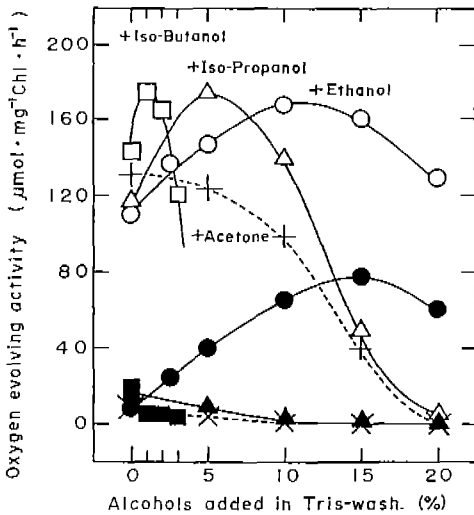


Fig. 1. Effect of alcohols and acetone on photoreactivation in Tris-treated chloroplasts. □, (TIB-treated)DCPIP₂-treated and photoreactivated; △, (TIP-treated)DCPIP₂-treated and photoreactivated; ○, (TE-treated)DCPIP₂-treated and photoreactivated; +, (TA-treated)DCPIP₂-treated and photoreactivated; ■, (TIB-treated)DCPIP₂-treated; ▲, (TIP-treated)DCPIP₂-treated; ●, (TE-treated)DCPIP₂-treated; ×, (TA-treated)DCPIP₂-treated. Oxygen evolution activity (PS II+PS I) was measured in a standard reaction mixture containing 50 mM HEPES buffer (pH 7.8, 2 mM NaCl) and 2 mM K₃[Fe(CN)₆], 0.05 % BSA, 2 mM NH₄Cl and 50 μg Chl/mL. Photoreactivation was performed by adding Mn²⁺, Ca²⁺ and DTT to the reaction mixture as described in Materials and Methods. Oxygen evolution activity (PS II+PS I) of normal chloroplast was 241±10 μmole O₂·mg Chl⁻¹·h⁻¹.

염색하여 gel이 투명하게 될 때까지 탈색한 후 셀로판지에 봉하여 암소에서 건조 보관하였다. 이 때 표준 단백질로는 SDS-PAGE marker용 cytochrome C를 사용하였다.

결과 및 고찰

광합성 활성 변화. 정상적인 엽록체의 산소발생 활성 (PS I+PS II)은 241±10 μmole O₂·mg Chl⁻¹·h⁻¹이었으며 Tris 처리된 엽록체를 대조구로하여 TIB 처리한 엽록체를 비교 연구하였다.

Tris 처리시 *iso*-butanol, *iso*-propanol, ethanol 및 acetone을 각각 첨가하여 DCPIP₂로 암소에서 20분간 암재활성화시킨 엽록체와 암재활성화시킨 엽록체에 망간, 칼슘 및 DTT를 첨가하여 20분간 광에서 재활성화시킨 엽록체의 산소발생 활성을 비교 측정하였다(Fig. 1).

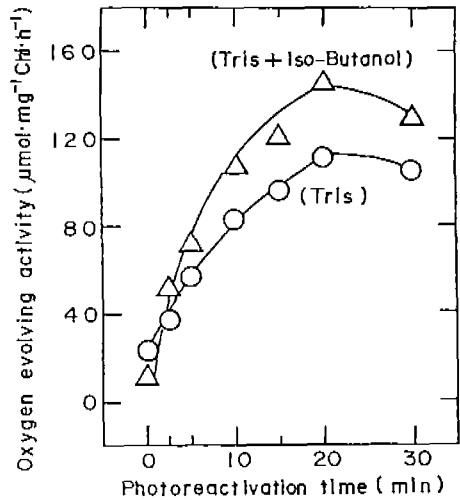


Fig. 2. Time course during photoreactivation in (Tris-treated)DCPIP₂-treated and (TIB-treated)DCPIP₂-treated chloroplasts. Measurement of oxygen evolution activity and photoreactivation were performed as explained in Fig. 1.

(Tris-ethanol)DCPIP₂ 엽록체의 산소발생 활성은 ethanol 15% 처리구에서 77 μmole O₂·mg Chl⁻¹·h⁻¹로 회복되었으나 (TIB)DCPIP₂ 엽록체, (Tris-*iso*-propanol)DCPIP₂ 엽록체 및 (Tris-acetone)DCPIP₂ 엽록체의 활성은 거의 회복되지 않았다. 그러나 (TIB)DCPIP₂ 엽록체, (Tris-*iso*-propanol)DCPIP₂ 엽록체, (Tris-ethanol)DCPIP₂ 엽록체 및 (Tris-acetone)DCPIP₂ 엽록체를 광에서 재활성화시키면 산소발생 활성이 크게 증가하였으며, 이 중 (Tris-acetone)DCPIP₂ 엽록체의 활성 회복이 가장 낮았다. 그리고 *iso*-butanol, *iso*-propanol 및 ethanol은 처리 농도가 각각 1, 5 및 10%에서 174, 173 및 167 μmole O₂·mg Chl⁻¹·h⁻¹로 산소발생 활성이 최대로 회복되었다. Treistman 등 (1987)의 실험에서 butanol, propanol 및 ethanol의 순으로 막의 자유화산을 증가시킨다고 한 보고와 본 실험에서 광재활성화시켰을 때의 활성이 높은 순서와 일치하였다. 위의 결과로부터 (TIB)DCPIP₂ 엽록체는 산소발생 활성이 가장 낮았으나 광재활성화로 산소발생 활성이 가장 많이 회복되었으므로 본 실험에서는 TIB 처리한 엽록체로 산소발생계의 광에 의한 재활성화 연구를 수행하였다.

(Tris)DCPIP₂ 엽록체와 (TIB)DCPIP₂ 엽록체의 광에 의한 재활성화 처리시간이 20분일 때 최대의 활성을 나타내었으며, 산소발생 활성은 각각 113과 145 μmole O₂·mg Chl⁻¹·h⁻¹로서 (TIB)DCPIP₂ 엽록체의 산소발생 활성이 약 30% 높았다(Fig. 2). 광재활성화 처리의 초기에는 (Tris)DCPIP₂ 엽록체의 활성이 높았으나 그 이후부터는 (TIB)

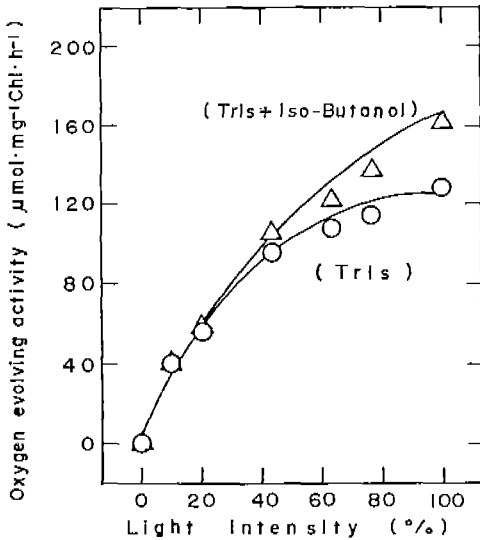


Fig. 3. Effect of light intensity on oxygen evolving activity of (Tris-treated)DCPIP_{H2}-treated and (TIB-treated)DCPIP_{H2}-treated in chloroplasts after photoreactivation. Measurement of oxygen evolution activity and photoreactivation were performed as explained in Fig. 1.

DCPIP_{H2} 염록체에서 점차 많이 증가하였으며 광재활성화 처리 20분일 때 최고의 활성을 나타내고 그 이후는 서서히 감소하였다. 광재활성화 시간이 20분일 때 양자의 염록체에서 최대의 활성을 나타내었으므로 본 실험에서는 광재활성화 처리 시간을 20분으로 하였다. (Tris)DCPIP_{H2} 염록체를 광재활성화한 후 산소발생 활성은 Yamashita(1982)의 실험에서 Tris 처리 후 재활성화 할 때의 시간에 따른 산소발생 활성 증가와 유사하다. Binder와 Bachofen(1979)는 저온처리로 Mn²⁺가 유출된 염록체에 빛을 조사할 경우 Mn²⁺가 틸라코이드막에 유입되므로 Mn²⁺ pool이 형성되어 광합성 전자전달의 활성이 회복된다고 한 바 있다. 이에 의하면 (TIB)DCPIP_{H2} 염록체가 (Tris)DCPIP_{H2} 염록체보다 광재활성화로서 활성이 높은 것은 TIB 처리로 인해 유출된 망간이 빛에 의해 틸라코이드막속으로 더 많이 축적되어 산소발생 활성이 높은 것으로 생각된다.

Fig. 3은 광에서 재활성화시킨 염록체의 산소발생 활성 측정시 빛의 강도에 따른 활성변화를 나타낸 것이다. 빛의 강도가 240 W·m⁻²를 100%로 보았을 때 빛의 강도가 20%까지는 (Tris)DCPIP_{H2} 염록체와 (TIB)DCPIP_{H2} 염록체에서 활성이 거의 같았으나 그 이상의 빛 강도에서는 (TIB)DCPIP_{H2} 염록체가 (Tris)DCPIP_{H2} 염록체보다 빛의 강도가 높을수록 활성이 점차 증가되어 100%의 빛 강도에서는 활성이 약 25% 더 높았다. 이 결과로부터 빛을 흡수하는 light harvesting chlorophyll a/b protein complex (LHCP)

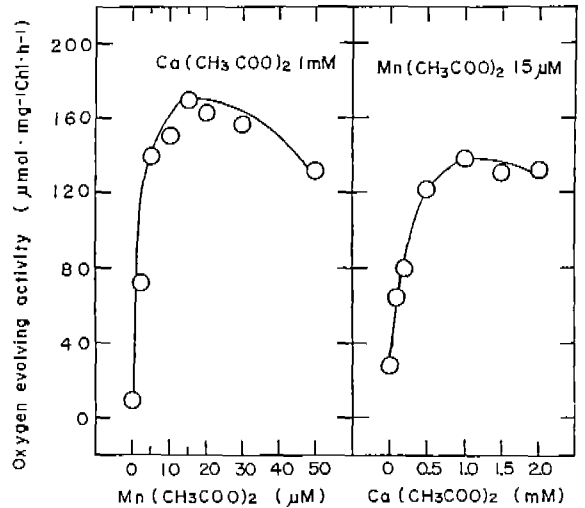


Fig. 4. Effect of Mn(CH₃COO)₂ and Ca(CH₃COO)₂ concentrations on photoreactivation in (TIB-treated)DCPIP_{H2}-treated chloroplasts. Measurement of oxygen evolution activity and photoreactivation were performed as explained in Fig. 1.

에서는 영향이 없고 빛을 흡수한 후 전자전달에 영향을 주었다는 것을 알 수 있다.

광에 의한 재활성화시 첨가되는 Ca²⁺와 Mn²⁺의 최적 농도를 알아보기 위하여 1 mM Ca(CH₃COO)₂의 농도에서 Mn(CH₃COO)₂의 농도를 변화시켰을 때 처리농도가 0~10 µM Mn(CH₃COO)₂까지는 급격히 활성이 증가하였으며 그 이후 완전히 상승하여 15 µM Mn(CH₃COO)₂의 처리농도에서 산소발생 활성이 최대가 되었으며 그 이후 서서히 감소하였다. 15 µM Mn(CH₃COO)₂의 농도에서 Ca(CH₃COO)₂의 농도를 변화시켰을 때에도 0~1 mM Ca(CH₃COO)₂의 농도까지는 급격히 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 점차 감소하였다(Fig. 4). 이 실험에서 망간과 칼슘이온의 최적 농도는 각각 15 µM과 1 mM이었으므로 본 실험의 광에 의한 재활성화 처리시 망간과 칼슘의 농도는 각각 15 µM과 1 mM로 하였다. Tris-처리로 인해 망간이 소실된 틸라코이드막에 망간, 칼슘 및 DTT를 첨가한 후 광 재활성화시키면 산소발생 활성이 증가한다고 Yamashita와 Ashizawa(1983)가 보고한 바 있다. 또한 Rashid 등(1991)의 실험에서도 망간과 칼슘 소실로 인해 광계 II 산화부위가 불활성화되었을 때 외부에서 망간과 칼슘을 첨가하면 활성이 회복된다고 보고한 바 있다. Yamashita와 Ashizawa(1985)는 Tris-처리한 grana에 Mn²⁺, Ca²⁺, Cl⁻ 및 DTT를 첨가한 후 광에 의한 재활성화하므로 소실된 망간이 틸라코이드막속으로 축적되어 산소발생계의 활성이 회복된다고 보고한 바 있으며 본 실험에서도 (TIB)DC-

Table 1. Effect of photoreactivation on (Tris-treated), (Tris-treated)DCPIP₂, (TIB-treated) and (TIB-treated) DCPIP₂-treated chloroplasts

Treatment	Activity ($\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	Control	Photoreactivation
(Tris-treated)	0	55
(Tris-treated)DCPIP ₂	32	126
(TIB-treated)	0	70
(TIB-treated)DCPIP ₂	16	177

Measurement of oxygen evolution activity and photoreactivation were performed as explained in Fig. 1.

PIP₂ 엽록체에 망간과 칼슘 및 DTT 첨가 후 20분간 광에서 재활성화시켰을 때 산소발생 활성이 회복되었다.

Tris 엽록체와 (Tris)DCPIP₂ 엽록체를 광 재활성화시켰을 때 산소발생 활성은 각각 55와 133 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이며 (TIB)엽록체와 (TIB)DCPIP₂ 엽록체의 광 재활성화시는 각각 70과 170 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 크게 증가하였다(Table 1). 그러므로 TIB 엽록체는 DCPIP₂로 암재활성화한 후 광재활성화시켰을 때 산소발생 활성이 최대로 회복되었다.

Tris 처리시와 DCPIP₂ 처리시 *iso*-Butanol의 첨가에 의한 영향을 알아보기 위하여 (Tris)DCPIP₂-*iso*-butanol 처리한 엽록체와 (TIB)DCPIP₂-*iso*-butanol 처리한 엽록체의 산소발생 활성은 각각 32와 8 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이지만 이것을 광재활성화시키면 각각 123과 180 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 증가하였다(Table 2). 이 결과로부터 TIB 엽록체에 DCPIP₂ 처리시 첨가된 *iso*-butanol의 영향은 미미하지만 Tris 처리시 포함된 *iso*-butanol의 영향이 크다는 것을 알 수 있다.

TIB 처리로 인하여 엽록체 틸라코이드막의 광합성 전자전달에 미치는 저해 부위를 알아보기 위하여 H₂O → FeCN, H₂O → PQ, DCPIP₂ → MV 및 PQ → MV로의 전자전달 활성을 조사하였다(Table 3). H₂O → FeCN으로의 전자전달(PS I+PS II) 활성은 (Tris)DCPIP₂ 엽록체와 (TIB)DCPIP₂ 엽록체 둘 다 광에 의한 재활성화한 후 활성이 각각 133과 170 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 회복되었으며, (TIB)DCPIP₂ 엽록체는 약 30%의 활성이 증가하였으나 짝풀림인자인 NH₄Cl을 첨가하지 않은 것의 활성은 짝풀림인자 첨가시보다 약 반이상 감소하여 각각 60과 65 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 비슷하였다. NH₄Cl 첨가시 활성이 크게 회복되는 것은 엽록체 틸라코이드막의 고에너지 상태를 해제시키기 때문이다.

H₂O → PQ로의 전자전달(PS II) 활성도 H₂O → FeCN으

Table 2. Effect of photoreactivation on (Tris-treated)DCPIP₂, (TIB-treated)DCPIP₂, (Tris-treated)DCPIP₂-*iso*-butanol and (TIB-treated)DCPIP₂-*iso*-butanol treated chloroplasts

Treatment	Activity ($\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	Control	Photoreactivation
(Tris-treated)DCPIP ₂	32	126
(TIB-treated)DCPIP ₂	16	177
(Tris-treated)DCPIP ₂ - <i>iso</i> -butanol	32	123
(TIB-treated)DCPIP ₂ - <i>iso</i> -butanol	8	180

Measurement of oxygen evolution activity and photoreactivation were performed as explained in Fig. 1.

로의 전자전달(PS I+PS II) 활성 증가와 유사하였다. DCPIP₂ → MV와 PQ → MV로의 전자전달(PS I) 활성은 (Tris)DCPIP₂ 엽록체와 (TIB)DCPIP₂ 엽록체 둘 다 광에서 재활성화하여도 전자전달 활성이 증가하지 않았다. 그러므로 (TIB)DCPIP₂ 처리 엽록체에서는 광계 II 활성이 많이 억제됨을 알 수 있으며 광재활성화 처리에 의하여 광계 I 활성은 변화가 없었으나 광계 II 활성은 많이 회복됨을 알 수 있다. (TIB)DCPIP₂ 엽록체의 산소발생 활성이 낮은 것은 Tris와 함께 처리된 1%의 *iso*-butanol로 인해 틸라코이드막에 부가적으로 영향을 주었기 때문이며 광재활성화했을 때 활성이 크게 회복된 것은 틸라코이드막의 투과성을 증가시켜 광에 의한 재활성화시 조사되는 광으로 인해 틸라코이드막속으로 Mn²⁺의 축적이 증가했기 때문으로 생각된다. 이러한 결과는 (TIB)DCPIP₂ 엽록체를 광재활성화시키면 광계 II 반응계가 가역적으로 회복되었다는 것을 나타낸다.

Tris-처리와 TIB 처리로 인해 산소발생계의 필수 원소인 Mn²⁺과 Ca²⁺의 영향을 알아보기 위하여 (Tris)DCPIP₂ 엽록체와 (TIB)DCPIP₂ 엽록체에 Mn²⁺과 Ca²⁺을 첨가하지 않고 광에 의한 재활성화시켰을 때 각각 19와 4 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 산소발생 활성이 억제되었으나 Mn²⁺만 첨가하지 않았을 때는 각각 30과 10 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이며, Ca²⁺만 첨가하지 않았을 때는 각각 50과 28 $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 (Tris)DCPIP₂ 엽록체가 (TIB)DCPIP₂ 엽록체에 비해 약간 높았으나 Mn²⁺과 Ca²⁺을 함께 첨가하면 (TIB)DCPIP₂ 엽록체의 활성이 높았다(Table 4). (Tris)DCPIP₂ 엽록체와 (TIB)DCPIP₂ 엽록체는 칼슘을 첨가하지 않는 것보다 망간을 첨가하지 않고 광재활성화시켰을 때 산소발생 활성이 낮게 나타난 것으로 보아 칼

Table 3. Effect of photoreactivation on (Tris-treated)DCPIP₂-treated and (TIB-treated)DCPIP₂-treated chloroplasts

Expts	Treatment	Addition	Activity (μmole O ₂ evolved or consumed O ₂ ·mg Chl ⁻¹ ·h ⁻¹)	
			Control	Photoreactivation
H ₂ O → FeCN (O ₂ evolving)	(Tris-treated)DCPIP	+ NH ₄ Cl	32	133
	(Tris-treated)DCPIP	- NH ₄ Cl	0	65
	(TIB-treated)DCPIP	+ NH ₄ Cl	16	170
	(TIB-treated)DCPIP	- NH ₄ Cl	0	60
H ₂ O → PQ (O ₂ evolving)	(Tris-treated)DCPIP	+ p-PD	25	140
	(Tris-treated)DCPIP	- p-PD	32	133
	(TIB-treated)DCPIP	+ p-PD	8	170
	(TIB-treated)DCPIP	- p-PD	16	170
DCPIP ₂ → MV (O ₂ consuming)	(Tris-treated)DCPIP	+ NH ₄ Cl	325	330
	(Tris-treated)DCPIP	- NH ₄ Cl	130	110
	(TIB-treated)DCPIP	+ NH ₄ Cl	325	340
	(TIB-treated)DCPIP	- NH ₄ Cl	125	130
PQ → MV (O ₂ consuming)	(Tris-treated)DCPIP	-	865	890
	(TIB-treated)DCPIP	-	900	900

Photoreactivation was performed as explained in Fig. 1.

Table 4. Effects of Mn²⁺ and Ca²⁺ on photoreactivation on (Tris-treated)DCPIP₂-treated and (TIB-treated)DCPIP₂-treated chloroplasts

Chloroplast treatment	Incubation (20 min)	Activity (μmole O ₂ ·mg Chl ⁻¹ ·h ⁻¹)
(Tris-treated)DCPIP ₂	-	19
∕	Complete	108
∕	-Mn ²⁺	30
∕	-Ca ²⁺	50
(TIB-treated)DCPIP ₂	-	4
∕	Complete	145
∕	-Mn ²⁺	10
∕	-Ca ²⁺	28

Measurement of oxygen evolution activity and photoreactivation were performed as explained in Fig. 1. 'Complete' means all the necessary factors for photoreactivation were present and '-Mn²⁺ or -Ca²⁺' means Mn²⁺ or Ca²⁺ was omitted from the reaction mixture of photoreactivation. '-' means Mn²⁺ and Ca²⁺ were omitted from the reaction mixture of photoreactivation.

습보다는 망간의 소실이 많은 것으로 생각되며 또한 망간과 칼슘을 첨가하여 광재활성화시킨 것의 산소발생 활성이 (Tris)DCPIP₂ 염록체보다 (TIB)DCPIP₂ 염록체에서 높게 회복된 것은 산소발생계의 망간과 칼슘의 작용이 촉진

되었음을 나타낸다. 그러므로 Tris 처리와 TIB 처리로 인한 역제는 광계 II에서 물의 광분해가 일어나는 산소발생계 부근이라는 것을 알 수 있다. 이상의 실험에서 Tris-처리한 염록체보다 TIB 처리한 염록체가 산소발생 활성이 낮았으나 DCPIP₂ 첨가하여 암재활성화와 망간, 칼슘 및 DTT를 첨가하여 광에 의한 재활성화시켰을 때 (Tris)DCPIP₂ 염록체에 비해서 (TIB)DCPIP₂ 염록체의 산소발생 활성이 증가한 것은 (TIB)DCPIP₂ 염록체를 광에 의한 재활성화시킴으로써 틸라코이드막의 투과성과 Mn²⁺의 축적이 촉진되어 산소발생 활성이 증가된 것으로 생각된다. 또한 TIB 처리로 Mn²⁺의 유출이 많아짐으로 인해 산소발생 활성이 저해되었으나 광재활성화 처리에 의하여 산소발생 활성이 가역적으로 증가되므로 광계 II의 산소발생계를 연구하기에 좋은 재료가 된다.

염록체의 틸라코이드막 단백질 폴리펩티드 밴드 유형의 변화. (TIB)DCPIP₂ 염록체를 광재활성화시킴으로 (Tris)DCPIP₂ 염록체를 광재활성화시켰을 때보다 활성이 높았으므로 이 두 염록체 틸라코이드막 단백질 폴리펩티드를 SDS-PAGE한 결과 (Tris)DCPIP₂ 염록체와 (TIB)DCPIP₂ 염록체의 틸라코이드막 폴리펩티드 밴드 유형에는 차이가 없었다(Fig. 5). Ebina와 Yamashita(1992)는 normal 염록체, Tris 처리한 염록체, Tris 처리한 후 암재활성화한 염록체, 그리고 Tris 처리한 후 암재활성화하고 광재활성화시킨 염록체의 틸라코이드막 단백질을 SDS-PAGE했을 때 광계 II 표재성 단백질 폴리펩티드 밴드 유형에는 차이가 없으며 Tris 처리로 분리된 표재성 단백

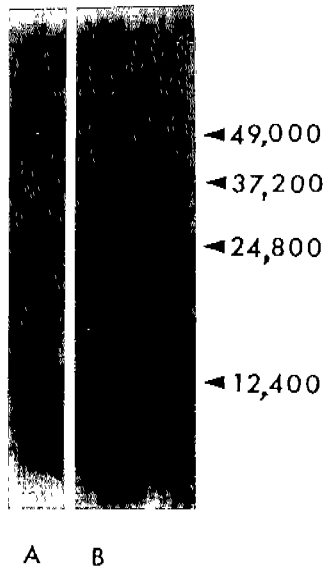


Fig. 5. Polypeptide bands of the spinach chloroplasts thylakoid membrane separated by SDS-PAGE. A, (Tris-treated)DCPIP₂-treated and photoreactivated chloroplasts; B, (TIB-treated)DCPIP₂-treated and photoreactivated chloroplasts.

질은 틸라코이드 네깅에 존재하다가 암재활성화와 광재활성화시킴으로 분리된 폴리펩티드가 재결합된다고 보고하였다. 그러므로 (Tris)DCPIP₂ 염록체와 (TIB)DCPIP₂ 염록체를 광재활성화시킨 후 SDS-PAGE하였을 때 단백질의 폴리펩티드 밴드 유형에 차이가 없는 것으로 보아 Tris 처리한 것보다 TIB 처리하므로 막의 투과성을 촉진시킨 것으로 생각된다. TIB 처리한 염록체의 광계 II 표재성 단백질 폴리펩티드의 분리와 재결합과정을 명확하게 설명하기 위하여서는 앞으로 광계 II 막을 분리하여서 실험을 수행하여야 될 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 TIB 처리한 염록체의 산소발생 활성의 저해는 산소발생계의 주요 요소인 망간의 유출이 많이 일어났기 때문이며, 광에 의한 재활성화 처리시 산소발생 활성이 높게 나타난 것은 틸라코이드막의 투과성을 증가시켜서 Mn²⁺과 H⁺의 축적을 촉진하므로 산소발생계에 영향을 미쳐서 산소발생 활성이 가역적으로 회복된 것으로 사료된다.

적 요

TIB 처리한 염록체가 Tris 처리한 염록체보다 산소발생 활성이 많이 억제되었으나 광재활성화 처리로 산소발생 활성이 높게 회복되었다. 그래서 TIB 처리한 염록체의 전

자전달계의 억제부위와 가역적인 광재활성화 기작을 알아 보기 위하여 광계 II와 광계 I의 활성을 산소발생 및 소모량으로 측정했으며 SDS-PAGE에 의한 염록체 단백질 폴리펩티드 양상의 차이를 조사하였다. 산소발생 활성 측정시 빛의 강도에 따른 산소발생 활성은 (TIB)DCPIP₂ 염록체와 (Tris)DCPIP₂ 염록체를 광재활성화시켰을 경우 빛의 강도가 약할 때는 거의 같았으나 빛의 강도가 높을수록 (TIB)DCPIP₂ 염록체의 산소발생 활성이 높았다. 이것은 빛을 흡수하는 LHCP에는 영향이 없고 빛을 흡수한 후 전자전달에 영향을 주었다는 것을 알 수 있다. (TIB)DCPIP₂ 염록체의 산소발생 활성은 (Tris)DCPIP₂ 염록체에 비해서 낮았지만 광에 의한 재활성화 처리시 광계 II 활성은 작플립인자인 NH₄Cl 첨가시 약 30% 높았지만 광계 I에는 활성의 차이가 없었다. 그러므로 Tris 처리한 염록체에 비해서 TIB 처리한 염록체에서 광계 II 활성이 더욱 감소하였으나, 광재활성화 처리로 광계 II 활성이 많이 회복되었다. Tris 처리한 염록체에 비해서 TIB을 처리한 염록체에 망간과 칼슘을 첨가하지 않고 광에 의한 재활성화했을 때의 산소발생 활성은 낮았으나 망간과 칼슘을 첨가하여 광에 의한 재활성화 했을 때는 산소발생 활성이 훨씬 높았다. 그러므로 TIB 처리로 인해 산소발생계의 망간과 칼슘의 유출이 많았으며, 망간과 칼슘을 첨가하여서 광재활성화시킴으로 오히려 망간의 축적이 많이 일어난 것으로 보인다. (Tris)DCPIP₂ 염록체와 (TIB)DCPIP₂ 염록체 단백질 폴리펩티드 양상에 차이가 없는 것으로 보아 isobutanol은 틸라코이드막의 투과성을 촉진시킨 것으로 생각된다.

사 사

본 연구에 친절한 지도와 조언을 해주신 주꾸바대학 생물과학계의 山下 魏 교수께 진심으로 감사하는 바이다.

참 고 문 헌

Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.

Atal, N., P.P. Saradhi and P. Mohanty. 1991. Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedling with low concentrations of cadmium: Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant Cell Physiol.* **32**: 943-951.

Binder, A. and R. Bachofen. 1979. Oxygen evolution and uptake as a measure of the light-induced electron transport in spinach chloroplasts. In, *Membrane Biochemistry: A Laboratory Manual on Transport and Bioenergetics*,

- Carafoli, E. and G. Semenza (eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 144-153.
- Critchley, C. 1981. Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. I. Effects of high light intensity on chloroplast activities in cucumber adapted to low light. *Plant Physiol.* **67**: 1161-1165.
- Ebina, M. and T. Yamashita. 1992. Evidence for strong relation between religation of Mn and reassembly of extrinsic polypeptides in reconstitution of O₂ evolving center of tris-inactivated spinach thylakoids by photoreactivation. *In*, Research in Photosynthesis. Murata, N. (ed.). Vol. II, Kluwer, Dordrecht. pp. 389-392.
- Feierabend, J., C. Schaan and B. Hertwig. 1992. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol.* **100**: 1554-1561.
- Fu, C.F. and M. Gibbs. 1988. Effects of temperature pretreatment in the dark on photosynthesis of the intact spinach chloroplast. *Plant Physiol.* **88**: 207-212.
- Jerry, B., B. Tadeusz, L.C. Fredrick and D.W. Krogmann. 1972. Selective inhibition of photosynthetic reactions by polycation. *J. Biol. Chem.* **247**: 2814-2819.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Mayfield, S.P. and A. Huff. 1986. Accumulation of chlorophyll, chloroplastic proteins, and thylakoid membranes during reversion of chromoplasts to chloroplasts in *Citrus sinensis* epicarp. *Plant Physiol.* **81**: 30-35.
- Nedbal, L., C. Gibas and J. Whitmarsh. 1991. Light saturation curves show competence of the water splitting complex in inactive photosystem II reaction centers. *Photosynth. Res.* **30**: 85-94.
- Obokata, J. 1987. Synthesis and assembly of the polypeptides of photosystem I and II in isolated etiochloroplasts of wheat. *Plant Physiol.* **84**: 535-540.
- Rashid, A., M. Bernier, L. Pazdernick and R. Carpentier. 1991. Interaction of Zn²⁺ with the donor side of photosystem II. *Photosynth. Res.* **30**: 123-130.
- Shen, T.R. and S. Katoh. 1991. Inactivation and calcium-dependent reaction of oxygen evolution in PS II preparation treated at pH 3.0 or with high concentration of NaCl. *Plant Cell Physiol.* **32**: 439-446.
- Shen, T.R. and Y. Inoue. 1991. Low pH-induced dissociation of three extrinsic proteins from O₂-evolving PS II. *Plant Cell Physiol.* **32**: 453-457.
- Treistman, S.N., M.M. Moynihan and D.E. Wolf. 1987. Influence of alcohols, temperature, and region on the mobility of lipids in neuronal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **898**: 109-120.
- Yamashita, T. and G. Tomita. 1974. Effects of manganese, calcium, dithiothreitol and bovin serum albumin on the light-reactivation of tris-acetone-washed chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **15**: 69-82.
- Yamashita, T. 1982. Effects of uncouplers on photo-reaction of tris (pH 8.8) and 2,6-dichlorophenol indophenol-treated chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **23**: 833-841.
- Yamashita, T. and A. Ashizawa. 1983. Factors required for photo-reactivation of tris-inactivated grana preparations. *In*, The Oxygen Evolving System of Photosynthesis, Inoue, Y., A.R. Crofts, Govindjee, N. Murata, G. Renger and K. Satoh (eds.). Academic Press, Tokyo. pp. 327-336.
- Yamashita, T. and A. Ashizawa. 1985. The role of chloride ion on the photoreactivation of the oxygen-evolving center of tris-washed, 2,6-dichlorophenol indophenol-terated grana. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**: 549-557.

(1993. 6. 21 接受)