

Dunaliella salina 당지질의 불포화반응에 미치는 암처리 및 DCMU의 효과

曹 聖 昊

(仁荷大學校 理科大學 生物學科)

Effects of Dark Treatment and DCMU on Desaturation of Galactolipids in *Dunaliella salina*

Cho, Sung Ho

(Department of Biology, Inha University, Incheon)

ABSTRACT

Effects of dark treatment and *N*₁-dichlorophenyl-*N*₃-dimethylurea (DCMU) on the desaturation of galactolipids of *Dunaliella salina* were investigated to see whether light-driven photosynthetic electron transport is involved in *in vivo* desaturation of galactolipids. The incorporation of radioactive fatty acid precursors (¹⁴C]lauric acid) into galactolipids, mainly composed of prokaryotic molecular species, was most affected among different polar lipid classes by both treatments. The analysis of specific radioactivities of individual galactolipid molecular species revealed that their synthesis was greatly inhibited by the treatments except for eukaryotic molecular species, 18 : 3/18 : 3 digalactosyldiacylglycerol, whose desaturation occurs in endoplasmic reticulum.

서 론

염록체의 틸라코이드막은 지질성분의 70% 이상이 monogalactosyldiacylglycerol(MGDG)과 digalactosyldiacylglycerol(DGDG)의 당지질(galactolipid)로 구성되어 있으며 이들은 그 지방산 구조에 이중결합이 많이 포함되어 있어 불포화도가 매우 높은 것이 특징이다. 이와 같은 당지질의 불포화반응은 당지질의 종류에 따라서 염록체와 소포체에서 각각 이루어지는 것으로 알려져 있다(Roughan and Slack, 1982; Joyard and Douce, 1987). 즉 당지질은 기본 골격이 되는 diacylglycerol 또는 phosphatidic acid의 합성 장소에 따라서 진핵성 당지질(glycerol backbone의 2번 위치에 C-18 지방산을 포함)과 원핵성 당지질(glycerol backbone의 2번 위치에 C-16 지방산을 포함)로 나누어진다. 진핵성 당지질의 불포화반응은 phosphatidylcholine(PC)의 형태로 oleic acid(18 : 1)로부터 linoleic acid(18 : 2)가 합성되는 과정이며 이 반응에는 NADH를 궁극적 전자공급원

으로 하는 소포체막의 cytochrome b₅-cytochrome b₅ reductase system이 관여하는 것으로 밝혀져 있다(Smith *et al.*, 1990; Kearns *et al.*, 1991). 한편 염록체에서 그 기본 골격이 형성되는 원핵성 당지질의 경우 구성지방산의 불포화반응은 stearic acid(18 : 0)로부터 oleic acid(18 : 1)로의 반응은 acyl carrier protein(ACP)과 결합한 형태로(Nagai and Bloch, 1968; Jaworski and Stumpf, 1974), 그리고 oleic acid(18 : 1)로부터 linoleic acid(18 : 2)를 거쳐 linolenic acid(18 : 3)로의 반응과 palmitic acid(16 : 0)로부터 hexadecatrienoic acid(16 : 3)까지의 반응은 당지질과 결합한 상태로 불포화반응의 전과정이 염록체내에서 이루어진다(Cho and Thompson, 1987; Giroud and Eichenberger, 1989; Heemskerck *et al.*, 1991). 최근 Schmidt and Heinz(1990)는 시금치의 잎으로부터 분리된 염록체를 재료로 하여, 그리고 Wada 등(1993)은 cyanobacteria에서 분리된 틸라코이드막을 사용한 *in vitro* 하에서의 연구를 통하여 이와 같은 원핵성 당지질의 불포화반응에 필요한 궁극적 전자 공급원은 ferredoxin으로서, 이는 광합성의 전자전달계에 의해 형성되거나(Schmidt and Heinz, 1990; Wada *et al.*, 1993)

본 연구는 1992년도 인하대학교 연구비 지원에 의한 결과임.

또는 암처리에서 NADPH로부터 형성되어(Schmidt and Heinz, 1990) desaturase로 전자를 공급하는 것으로 보고 하였다. 본 연구에서는 당지질의 대부분이 원핵성인 단세포 녹조 *Dunaliella salina*를 이용하여 암처리 효과와 광합성 전자전달계의 억제물질인 N_1 -dichlorophenyl- N_3 -dimethylurea(DCMU) (Trebst, 1980)를 처리하여 당지질의 불포화 반응이 어떠한 영향을 받는가를 살펴 봄으로서 *in vivo* 상태에서 광합성 전자전달계가 불포화반응에 관여하는 정도를 조사하였다.

재료 및 방법

***D. salina* 배양.** *Dunaliella salina*(UTEX 1644)의 세포를 일정 광조건하($500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)에서 30°C 로 액체 배양하였으며(Lynch and Thompson, 1982) 세포밀도는 Coulter counter(Model ZB)를 이용하여 측정하였다. 산소발생은 Clarke-type electrode(YSI 5331 probe; Yellow Springs Instruments)로 25°C 에서 측정하였다.

암처리 및 DCMU의 처리. 세포밀도가 $1.0 \sim 1.2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 에 도달했을 때 이들 세포에 $20 \mu\text{Ci}$ 의 [^{14}C]lauric acid(12:0)를 처리하여 2분간 배양한 뒤 labeling된 세포를 수확하여 동위원소가 함유되지 않은 배지에 계대배양하였다. 이때 일부는 암처리하고 또 다른 일부는 광조건하에서 $1 \mu\text{M}$ 또는 $5 \mu\text{M}$ 의 DCMU를 처리하여 대조구와 함께 4시간 동안 배양한 다음 세포를 수확하여 세포내 함유된 방사능을 측정하였다.

지질의 분석. Bligh and Dyer(1959)의 방법에 의하여 각 처리구로부터 지질을 추출하여 2차원 TLC(Silica gel H)를 이용하여 구성지질로 분리하였다(Cho and Thompson, 1987). 1차 전개는 acetone : acetic acid : water(100 : 2 : 1)의 용매를 이용하였으며, 2차 전개는 chloroform : acetic acid : methanol : water(75 : 25 : 5 : 2.2)의 용매를 이용하였다. 중성지질은 petroleum ether : ether : acetic acid(70 : 30 : 1)의 용매를 이용하여 따로 분리하였다. 각 구성지질의 방사능은 Packard Instrument Tri-Carb liquid scintillation counter (Model 300)를 이용하여 측정하였다(Cho and Thompson, 1986). MGDG와 DGDG는 TLC plate로부터 해당 부분을 분리하여 chloroform : methanol : water(3 : 5 : 1)의 용매를 이용하여 추출하였으며(Cho and Thompson, 1986), Dubois 등의 방법으로 정량하였다(Dubois *et al.*, 1956). MGDG와 DGDG는 methanol : water(95 : 5)를 용매로 하는 HPLC system(Waters model 510 dual-piston pump; U6K injector; 25 cm \times 4.6 mm Rainin Microsorb $5 \mu\text{m}$ reverse-phase column)을 이용하여 각 구성 molecular species로 분리하여 205 nm에서 측정하였으며, 각각의 방사능은 Flo-1 Beta model IC HPLC radioactive flow de-

tector로 측정하였고(Cho and Thompson, 1987) 정량은 HPLC와 연결된 Tracor 945 flame ionization LC detector를 이용하였다(Smith *et al.*, 1985).

결과 및 고찰

우선 DCMU가 *D. salina*의 광합성 전자전달계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 산소발생을 조사한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 $1 \mu\text{M}$ 이상에서 완전 억제되었다. DCMU는 광합성 광계 II의 반응중심에 있는 D1 단백질에 plastoquinone과 경쟁적으로 결합하여 전자전달계를 억제하는 것으로 보고되어 있다(Trebst, 1986). 따라서 본 연구에서는 $1 \mu\text{M}$ 과 $5 \mu\text{M}$ 의 DCMU 및 암처리를 하여 이들이 *D. salina*의 지질 합성 및 당지질의 불포화반응에 미치는 영향을 조사하였다.

[^{14}C]lauric acid(12:0)를 세포에 2분 동안 처리하였을 때 여러 지질들이 모두 방사능을 나타내어 이 지방산이 지질 합성의 전구물질로 이용되었음을 알 수 있다(zero time, Table 1). 12:0는 *D. salina*의 지방산 합성 경로에 의해 C-16과 C-18의 지방산으로 합성되며 또한 불포화되는 것으로 이미 확인된 바 있다(Cho and Thompson, 1987). 배양 초기에 50% 이상의 방사능이 triacylglycerol에서 나타났는데 이는 세포내 지방산의 일시적 증가에 따라 이를 저장하기 위한 현상으로 생각되며 4시간 후에는 대조구의 방사능 분포에서 나타난 것과 같이 이들이 당지질과 인지질 등의 극성 지질 합성에 이용되었음을 알 수 있다. 암처리구와 DCMU 처리구의 방사능 분포를 조사한 결과 MGDG, 와 DGDG와 같은 당지질은 강한 억제를 받은 반면 나머지 지질들은 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났다(Table 1). 이와 같은 결과는 당지질의 대부분이 원핵성으로서 광합성 전자전달계에 의한 전자공급의 부족으로 인하여 구성 지방산의 불포화반응이 억제되었기 때문으로 사료된다. 이에

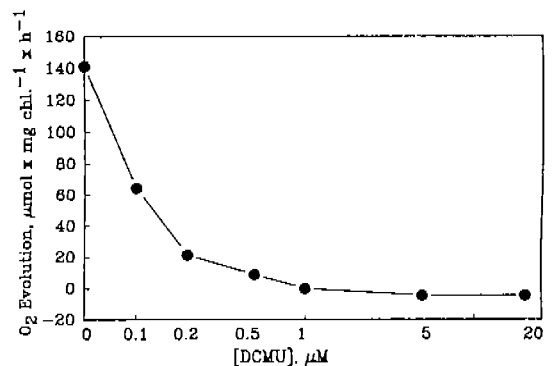


Fig. 1. Effect of DCMU concentrations on oxygen evolution of *D. salina* cells.

Table 1. Incorporation of radioactivity into different lipid classes after 4 hr treatment of darkness or DCMU. Values represent the percentage of radioactivity in the total lipid

Lipid class ^a	0 time	Light	Dark	DCMU	
				1 μM	5 μM
Polar lipids					
MGDG	5.9	14.6	10.2	10.0	9.6
DGDG	3.6	13.8	10.9	11.2	10.5
SL	7.5	14.6	16.8	15.9	15.0
PE	1.6	3.7	3.3	3.1	3.6
PG	7.7	11.8	13.4	13.1	13.6
PC	1.9	5.7	5.7	5.3	5.2
PI	1.2	3.3	3.5	3.2	3.1
DGTS	1.6	5.5	5.8	5.0	4.6
Neutral lipids					
FFA	3.5	1.4	2.3	2.2	2.3
DG	10.3	9.4	5.3	6.3	5.3
TG	54.0	11.9	19.2	21.6	24.1

^aMGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; SL, sulfolipid; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; DGTS, diacylglyceryltrimethylthomoserine; FFA, free fatty acid; DG, diacylglycerol; TG, triacylglycerol.

비해 같은 원핵성의 지질인 황지질(sulfolipid)의 경우는 이 기간 동안 암처리와 DCMU 처리의 영향을 받지 않은 것으로 보이는데 이는 황지질의 구성 지방산 중 68%가 16:0 으로서 더 이상 불포화되지 않으며 C-18 지방산의 불포화반응이 비교적 빨리 일어난다는 사실(Lynch and Thompson, 1982)에 기인하는 것으로 보인다.

실제로 당지질의 지방산 불포화반응이 암처리와 DCMU 처리에 의해 억제되었나를 보기 위하여 molecular species의 지방산능을 조사하였다(Table 2). MGDG의 경우 약 90%를 차지하는 18:3/16:4와 나머지 molecular species 모두 암처리구와 DCMU 처리구에서 지방산능이 대조구보다 낮게 나타나 이들의 합성이 억제되었음을 알 수 있다. 불포화도가 높은 이들 molecular species는 18:1/16:0 MGDG의 불포화반응에 의해 합성되므로(Cho and Thompson, 1987) 암처리와 DCMU 처리에 의하여 불포화반응이 억제된 것으로 보인다. DGDG의 경우도 MGDG와 마찬가지로 정도의 차이는 있으나 처리구의 모든 molecular species들의 합성이 억제되었다. 단 18:3/18:3의 경우는 영향을 받지 않거나 약한 억제를 받은 것으로 나타났는데 이는 18:3/18:3이 진핵성 당지질로서 그 불포화반응이 소포체에서 일어나기 때문에 광합성 전자전달계의 영향을

Table 2. Specific radioactivities of major MGDG and DGDG molecular species after 4 hr treatment of darkness or DCMU. Values represent dpm/μmol×10⁻³

Molecular species ^a	0 time	Light	Dark	DCMU	
				1 μM	5 μM
MGDG					
18:3/16:4	0	21	13	15	14
18:3/16:3 ^b ,					
18:2/16:4	8	176	89	100	98
DGDG					
18:3/16:4	2	23	20	18	17
18:3/16:3 ^b	4	60	35	43	34
18:3/16:2,					
18:2/16:3	42	191	155	170	151
18:3/18:3	6	13	16	18	10
18:3/16:0	8	72	50	56	63
18:2/16:0	142	214	174	153	168

^aPairs of numbers representing fatty acids when separated by a slash represent the components in the *sn*-1 and *sn*-2 positions, respectively, of a lipid molecule. ^b16:3 is all *cis*-7,10,13-hexadecatrienoic acid. 16:3i is an isomer of 16:3, tentatively identified either as all *cis*-4,7,10-hexadecatrienoic acid or as all *cis*-6,9,12-hexadecatrienoic acid.

받지 않았거나 적게 받았기 때문으로 사료된다. 또한 암처리와 DCMU 처리에 의해 원핵성 당지질의 불포화반응이 완전히 억제되지 못한 것은 ferredoxin:NADP oxidoreductase에 의하여 NADPH로부터 환원력을 공급받아 부분적인 불포화반응이 일어날 수 있다는 사실(Schmidt and Heinz, 1990)에 기인하는 것으로 여겨진다. NADPH는 엽록체 스트로마의 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 의하여 5탄당인산회로에서 합성되며 이 효소는 암처리에 의하여 활성화되는 것으로 보고되어 있다(Yuan and Andersen, 1987).

이와 같은 결과는 세포를 혐기적 조건하에서 배양하거나 또는 또 다른 광합성 전자전달 억제물질인 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone(DBMIB) (Trebst, 1980)를 사용한 실험에 의해서도 확인되었으며(Cho, 미발표결과), 이는 원핵성 당지질의 불포화반응에 광합성 전자전달계에 의해 합성되는 환원력이 필요하다는 Schmidt and Heinz(1990)와 Wada *et al.*(1993)의 연구를 뒷받침하는 좋은 결과라 할 수 있다.

적 요

원핵성 당지질의 불포화반응에 광합성 전자전달계의 관

여 여부를 알아보기 위하여 *Dunaliella salina*의 당지질 합성에 미치는 암처리와 DCMU 처리의 영향을 조사하였다. 지방산 선구물질인 [¹⁴C]lauric acid를 이용하여 지질 합성을 조사한 결과 극성 지질 중에서 주로 원핵성의 molecular species로 구성되어 있는 당지질의 합성이 암처리와 DCMU 처리에 의해 가장 많이 억제되었다. 당지질의 각 molecular species의 지방사능 분석 결과 암처리와 DCMU 처리에 의하여 그 생합성이 모두 억제되었으며 불포화반응이 소포체에서 일어나는 진핵성 당지질인 18:3/18:3 DGDG의 경우는 이에서 제외되었다.

참 고 문 헌

- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Cho, S.H. and G.A. Thompson, Jr. 1986. Properties of a fatty acyl hydrolase preferentially attacking monogalactosyldiacylglycerols in *Dunaliella salina* chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **878**: 353-359.
- Cho, S.H. and G.A. Thompson, Jr. 1987. On the metabolic relationship between monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol molecular species in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem.* **262**: 7586-7593.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 50-56.
- Giroud, C. and W. Eichenberger. 1989. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **30**: 121-128.
- Heemskerk, J.W.M., H. Schmidt, U. Hammer and E. Heinz. 1991. Biosynthesis and desaturation of prokaryotic galactolipids in leaves and isolated chloroplasts from spinach. *Plant Physiol.* **96**: 144-152.
- Jaworski, J.G. and P.K. Stumpf. 1974. Fat metabolism in higher plants; properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing *Carthamus tinctorius*. *Arch. Biochem. Biophys.* **162**: 158-165.
- Joyard, J. and R. Douce. 1987. Galactolipid synthesis. In: *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf (ed.). Vol. 9, Academic Press, New York. pp. 215-274.
- Kearns, E.V., S. Hugly and C.R. Somerville. 1991. The role of cytochrome *b₅* in Δ^{12} desaturation of oleic acid by microsomes of safflower (*Carthamus tinctorius*, L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **284**: 431-436.
- Lynch, D.V. and G.A. Thompson, Jr. 1982. Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **69**: 1369-1375.
- Nagai, J. and K. Bloch. 1968. Enzymatic desaturation of stearyl acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* **243**: 4626-4633.
- Roughan, P.G. and C.R. Slack. 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 97-132.
- Schmidt, H. and E. Heinz. 1990. Involvement of ferredoxin in desaturation of lipid-bound oleate in chloroplasts. *Plant Physiol.* **94**: 214-220.
- Smith, L.A., H.A. Norman, S.H. Cho and G.A. Thompson, Jr. 1985. Isolation and quantitative analysis of phosphatidylglycerol and glycolipid molecular species using reversed-phase high-performance liquid chromatography with flame ionization detection. *J. Chromatogr.* **346**: 291-299.
- Smith, M.A., A.R. Cross, T.G. Jones, W.T. Griffiths, S. Stymerne and K. Stobart. 1990. Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine Δ^{12} -desaturase (Δ^{12} -desaturase) in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons. *Biochem. J.* **272**: 23-29.
- Trebst, A. 1980. Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods in Enzymology* **69**: 675-715.
- Trebst, A. 1986. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* **41c**: 240-245.
- Wada, H., H. Schmidt, E. Heinz and N. Murata. 1993. *In vitro* ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes. *J. Bacteriol.* **175**: 544-547.
- Yuan, X.-H. and L.E. Andersen. 1987. Changing activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea chloroplasts during photosynthetic induction. *Plant Physiol.* **85**: 598-600.

(1993. 6. 11 接受)