

## Cyanobacteria를 이용한 광합성 전자전달저해제의 생합리적 스크리닝

황인택\* · 홍경식\* · 조광연\* · 요시다 시게오\*\*

### Biorational Screening System Using Cyanobacteria (*Anacystis nidulans R<sub>2</sub>*) for Searching the Photosynthetic Electron Transport Inhibitors

Hwang I.T.\*, K.S. Hong\*, K.Y. Cho\*, S. Yoshida\*\*

#### ABSTRACT

For searching the photosynthetic electron transport(PET) inhibitors, bio-rational screening system using thylakoid membranes extracted from wild and mutant cyanobacteria (*Anacystis nidulans R<sub>2</sub>*) was developed. Generally, thylakoid membrane was more sensitive to the tested herbicides than the chloroplast from spinach in the Hill reaction.

Higher resistant characteristics appeared in mutant D-5, Di-22 to diuron and mutant G-264 to atrazine as compared to wild type. To test the reaction of thylakoid membrane to herbicides, diuron and atrazine were applied simultaneously. Diuron and atrazine competed each other for binding with substituted amino acids, while diuron and dinoseb were non-competitive, and inhibiting activity was increased. Conclusively, bio-rational screening system using cyanobacteria was proved to be fast and efficient screening method for the development of PET inhibitors.

**Key words :** photosynthetic electron transport, cyanobacteria (*Anacystis nidulans R<sub>2</sub>*), Hill reaction, thylakoid membrane, wild type, mutant D-5, Di-22, and G-264, bio-rational screening system

#### 서 언

새로운 제초제의 개발과정은 신규 화합물의 합성과 스크리닝, 안전성시험 및 제제 공정개발 등 여러 단계를 거치며 엄청난 개발비가 요구된다. 그 중에서도 스크리닝은 화합물의 생리활성을 검정하는 단계로 세계적으로 유수한 농약업체들은 대부분 신농약 연구개발비의 36% 정도를 스크리닝 관련연구에 투자하여 대부분 자체 스크리닝

시설과 고유의 스크리닝 기술을 개발 확보하여 Know-How로 축적하고 있으며, 보다 효율적으로 화합물의 활성을 평가할 수 있도록 계속적으로 방법을 보완 발전시키고 있다. 기존 약제보다 적은량으로 보다 강력하고 광범위한 제초활성을 나타내면서 동물에는 피해를 주지 않고 식물에만 특이적으로 작용하는 제초제를 개발하기 위해서는 동물에는 없고 식물에만 존재하는 생리과정을 작용점으로 할 때 그 가능성이 높아질 수 있다. 즉 식물체에서의 기존제초제의 작용점 또는 가

\* 한국화학연구소(KRICT, P.O. Box 9, Daedeogdanji, Daejeon 305-606, Korea)

\*\* 일본이화학연구소(RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research, Hirosawa 2-1, Wako -shi, Saitama 351-01, Japan)

<1993. 4. 27 접수>

능성 있는 작용점을 대상으로 화합물의 결합부위, 결합특성 등을 파악하여 이를 토대로 새로운 화합물을 만든 후에 활성을 평가하고 보다 큰 조직 또는 기관으로 확대하고 이어서 전체 식물체에 적용하여 확인하는 방법이 시도되고 있다. 이것이 바로 biorational approach로서 측쇄 아미노산의 생합성 효소인 acetolactate synthase와 같은 효소를 대상으로 하거나, 광합성 전자전달계가 위치한 thylakoid membrane과 같은 작용부위를 대상으로 스크리닝을 시작해서 전체 식물체에 적용 확인하는 방법이다<sup>10)</sup>.

따라서 본 연구는 광합성 전자전달계를 대상으로 수행되는 생합리적 스크리닝 방법을 체계화하기 위하여 몇 가지 광합성 저해약제를 대상으로 광합성 박테리아의 일종인 cyanobacteria와 이의 mutant로부터 분리한 thylakoid membrane을 이용한 반응성 조사를 실시하여 고등식물인 시금치의 chloroplast에 대한 반응성과 비교하고, 기존 제초제인 diuron과 atrazine 및 diuron과 dinoseb의 혼합처리시의 전자전달저해활성을 측정하였으며 또한 thermoluminescence를 통해서 결합부위를 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**Cyanobacteria의 배양:** BG-11영양액<sup>2)</sup>으로 0.8% 한천배지를 만들어 일회용 petridish에 5ml 씩 분주, 응고시킨 다음 cyanobacteria 표준형과 D<sub>1</sub> 단백질의 구성 아미노산 변이주인 Di-1, G-264, D-5, Di-22, TYR-5 등 모두 6종의 균

주를 접종하고 27~28°C의 배양기에서 6,000Lux의 광도를 유지시키면서 3주 간격으로 계대 배양하였다.

**Cyanobacteria로부터 thylakoid membrane의 분리:** 먼저 BG-11영양 50ml를 담은 시험관에 계대배양한 균주를 접종하고, 마개를 통해서 3% CO<sub>2</sub>를 공급해 주면서 연속광하에서 3~4일간 배양하였다. 이상 변이균주를 제거시키고 정상 변이주만을 3~4일간 다시 배양하고, 이를 배양병으로 옮겨 1분에 60회의 속도로 진탕하면서 증식 배양한 후 thylakoid membrane 분리용 시료로 이용하였다(그림 1). Thylakoid membrane의 분리는 배양된 cyanobacteria를 원심분리(35°C, 10min., 3,700g)하여 상등액은 버리고 소량의 완충용액(표 1의 medium-1)을 이용하여 하나의 원심분리관으로 모아서 원심분리(35°C, 10min., 4,800g)한 후 다시 상등액을 버리고 Paterson과 Arntzen<sup>6)</sup>의 방법에 준하여 분리하였다. 먼저 35°C의 0.4M mannitol용액(medium-2)을 가해서 혼탁액 중의 chlorophyll 최종농도가 0.25mg chl./ml가 되도록 회석하였다. 혼탁액 중의 chloroplast 세포막을 파괴하기 위해서 lysozyme(EC, 3, 2, 1, 17 Grade-1, Sigma 시약)과 EDTA(medium-3)를 각각 최종농도 1.5mg/ml와 2mM이 되도록 넣고 10초간 혼들어준 다음 35°C shaking waterbath에서 암조건으로 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리(35°C, 10min., 12,000g)하여 상등액을 버리고 100ml의 medium-2를 가하여 혼탁시킨 후 다시 원심분리(35°C, 10min., 12,000g)하였다.

Table 1. Composition of media for extracting thylakoid membrane from cyanobacteria.

Medium 1. Potassium phosphate buffer solution : 50mM(pH 6.8)
Medium 2. Mannitol solution : 0.4M mannitol solved in 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)
Medium 3. EDTA stock soln : 200mM EDTA solved in potassium phosphate buffer(pH 6.8)
Medium 4. HEPES buffer soln : 20mM HEPES(pH 7.0) ... Keep in 0.5°C
Medium 5. MgCl <sub>2</sub> stock soln : 1M MgCl <sub>2</sub> solved in 20mM HEPES buffer(pH 7.0)
Medium 6. DNase- I stock soln : 5mg/5ml ... Keep in 0~5°C
Medium 7. Sucrose solution(1) : 2M sucrose and 10mM MgCl <sub>2</sub> solved in 50mM HEPES buffer solution(pH 7.0)
Medium 8. Sucrose solution(2) : 1M sucrose and 10mM MgCl <sub>2</sub> solved in 50mM HEPES buffer solution(pH 7.0)
Medium 9. Sucrose solution(3) : 0.5M sucrose and 10mM MgCl <sub>2</sub> solved in 50mM HEPES buffer solution (pH 7.0)

다. 원심분리 후 상등액을 버리고 4ml의 medium-2를 가하여 혼탁시킨 후  $MgCl_2$ 용액 (medium-5) 0.3ml와 DNase-I 2~3방울 (medium-6), 2M sucrose용액 (medium-7) 15ml를 넣고 0°C로 보존된 HEPES buffer (medium-4)용액으로 전체가 60ml가 되도록 한

다음 5분간 35°C에서 진탕하여 원심분리 (0°C, 15min., 36,000g)하였다. 원심분리 후 상등액을 버리고 1M sucrose (medium-8)용액을 가하여 혼탁시킨 후 2~3회 원심분리 (0°C, 15min., 36,000g)하였다. 원심분리가 끝난 후 최종적으로 상등액을 버리고 3~5ml의 0.5M sucrose

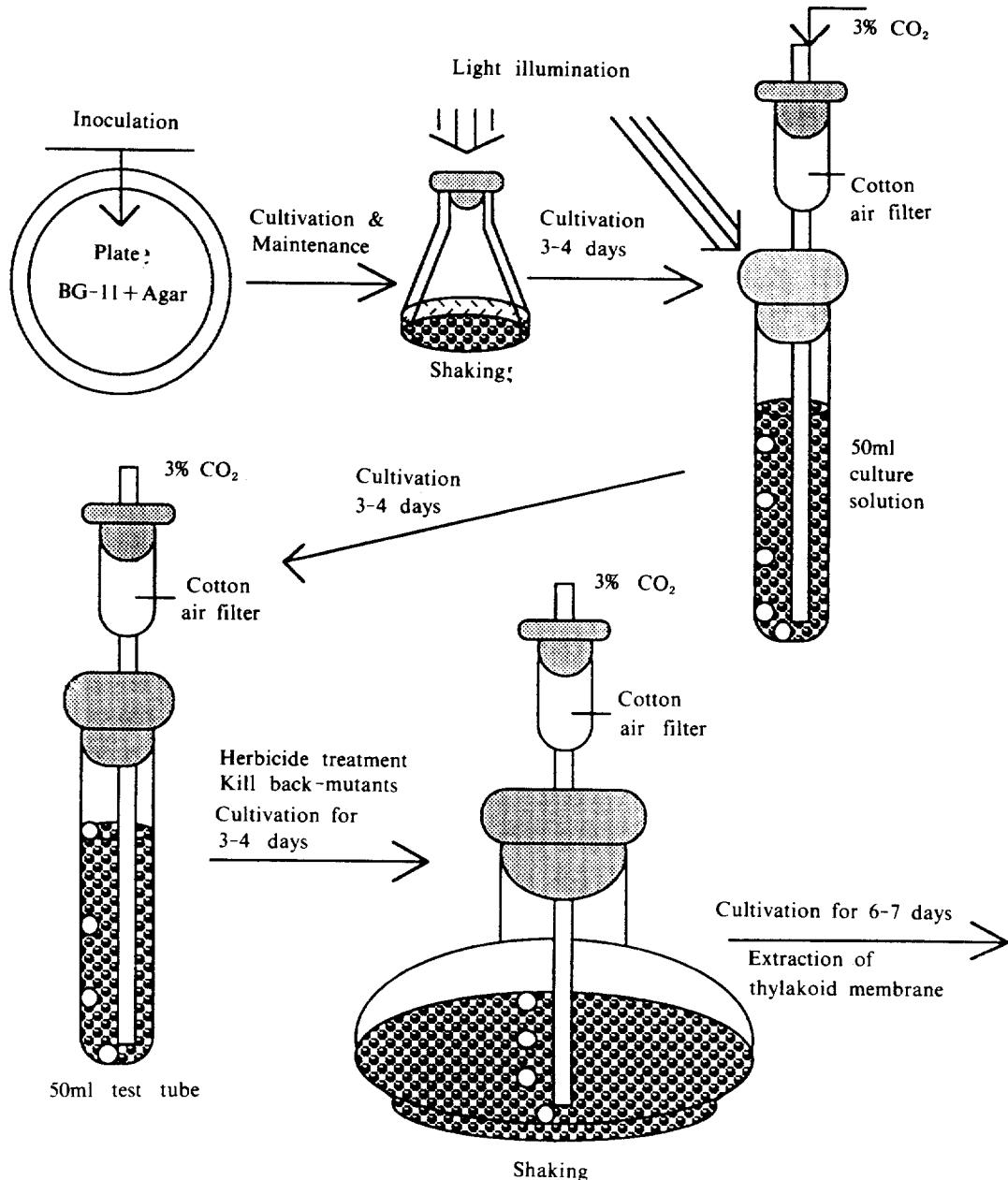


Fig. 1. Procedure of cyanobacteria (*Anacystis nidulans* R<sub>2</sub>) cultivation.

(medium-9) 용액을 가하여 혼탁시킨 후 chlorophyll 함량<sup>1)</sup>을 측정하고 이를 분리된 thylakoid membrane으로 실험에 사용하였다. 나머지는 액체질소 중에 보관하면서 다음 실험에 이용하였다.

시금치 잎으로부터 chloroplast의 분리 : 시금치 (*Spinacia oleracea*) 잎 40g을 취하고 160ml의 추출용액 (0.4M sucrose, 10mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10mM NaCl)을 용해시킨 0.05M buffer pH 7.8)으로 homogenization시켜 cheese cloth로 여과시켰다. 여액을 원심분리 (0°C, 10min., 8,000g) 하여 상등액은 버리고 침전물에 소량의 tricine buffer (pH 7.8) 용액을 가하여 혼탁시켰다. 이를 다시 원심분리 (0°C, 2min., 500g) 하여 얻은 상등액은 tricine buffer (pH 7.8) 용액 50ml를 추가한 후 다시 원심분리 (0°C, 10min., 8,000g)하고 상등액은 버린다. 침전물에 5ml의 tricine buffer (pH 7.8) 용액을 가하여 혼탁시키고 chlorophyll 함량을 측정하여 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다<sup>6)</sup>.

Hill 반응측정 : Hill 반응측정은 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP)을 기질로 하는 비색법을 사용하였다. 반응혼합액 (20mM methylvamine, 50μM DCPIP, 10mM NaCl)을 녹인 10mM HEPES buffer pH 7.0)을 1.9ml씩 일회용 spectrophotometer cell (Kartell cuvettes)에 넣고 실험하고자 하는 화합물 (전자전달저해제)을 methyl alcohol에 용해시켜 20μl씩 처리하였다. 0.1mg chl./ml 농도로 50mM potassium phosphatebuffer (medium-1) 용액으로 희석시킨 thylakoid membrane 혼탁액을 80μl씩 첨가하여 전체가 2ml가 되도록 한 후, 광 (5,000Lux)을 조사시켜 반응을 진행시켰다. 5분 후 발생된 H<sup>+</sup>

에 의해서 지시약 (전자흡수체) DCPIP가 변화되는 색상을 spectrophotometer를 이용하여 590nm에서의 흡광도로 측정하였다<sup>4,6)</sup>.

**Thermoluminescence**를 이용한 결합부위의 비교실험 : 열발광장치는 크게 여기장치 (섬광발생장치), 냉각장치, 가온장치, 전자수 측정장치, 발생에너지 측정장치, 기록장치로 구분되어 있는 일본 이화학연구소 태양광에너지연구실의 자체 조립장치를 이용하였다. 실험방법은 1cm<sup>2</sup>의 filter paper에 thylakoid membrane suspension을 분산 흡수시키고 저해제를 처리한 후 암조건에서 10<sup>-7</sup>초 동안의 섬광을 조사시킨 직후 액체질소에 넣어 -190°C 정도로 급격하게 온도를 내리고 다시 +80°C 까지 서서히 올려주면서 나타나는 열발광 peak를 조사하였다<sup>5,9)</sup>.

## 결과 및 고찰

Cyanobacteria에서 분리한 thylakoid membrane과 시금치로 부터 분리한 chloroplast를 사용하여 기존 제초제의 전자전달저해활성을 조사한 결과 (표 2)에서 thylakoid membrane에 대한 각 약제의 활성을 비교해 보면 diuron의 저해활성이 가장 높게 나타났고, atrazine, bromacil, ioxynil, dinoseb, nitrofen의 순이었다. 이들을 고등식물인 시금치의 chloroplast에 대한 저해활성과 비교하면 diuron, atrazine, bromacil 등에 대해서는 비슷한 반응성을 보여 주었지만, ioxynil, dinoseb, nitrofen의 경우 thylakoid membrane이 시금치의 chloroplast 보다 민감한 반응을 보여주었다. 이러한 반응성 차이는 전자전달반응이 thylakoid membrane에서 일어나기 때문에 이를 둘러싸고 있는 chloroplast mem-

Table 2. Comparison of a 50% inhibition concentration of herbicides at the Hill reaction between thylakoid membrane extracted from cyanobacteria and chloroplast from spinach.

Herbicide	50% inhibition concentration (M)	
	Thylakoid membrane	Chloroplast
Diuron	2.7 × 10 <sup>-8</sup>	3.0 × 10 <sup>-8</sup>
Atrazine	3.9 × 10 <sup>-7</sup>	9.5 × 10 <sup>-7</sup>
Bromacil	4.2 × 10 <sup>-7</sup>	3.5 × 10 <sup>-7</sup>
Ioxynil	4.1 × 10 <sup>-7</sup>	3.0 × 10 <sup>-5</sup>
Dinoseb	9.5 × 10 <sup>-7</sup>	7.5 × 10 <sup>-6</sup>
Nitrofen	1.6 × 10 <sup>-6</sup>	3.6 × 10 <sup>-4</sup>

**Table 3.** 50% inhibition concentration of herbicides at the Hill reaction to the thylakoid membrane extracted from four cyanobacteria mutants.

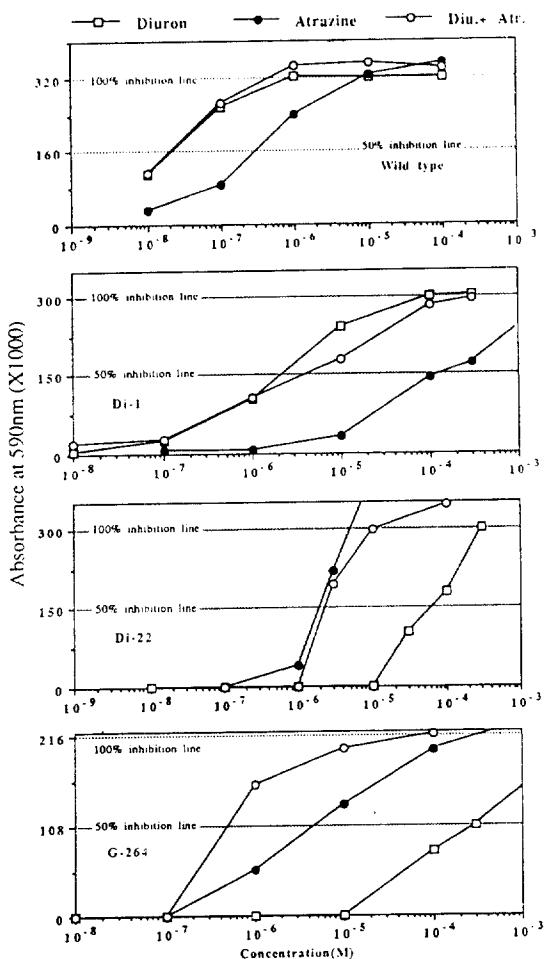
Herbicide	50% inhibition concentration (M)			
	TYR-5 255Phe. → Tyr.	G-264 264Ser. → Gly.	D-5 255Phe. → Tyr. 264Ser. → Ala.	Di-22 255Phe. → Leu. 264Ser. → Ala.
Diuron	$9.0 \times 10^{-9}$ (0.3)	$1.5 \times 10^{-7}$ (5.6)	$2.1 \times 10^{-5}$ (778)	$5.6 \times 10^{-5}$ (2074)
Atrazine	$8.2 \times 10^{-6}$ (21)	$4.0 \times 10^{-4}$ (1025)	$1.6 \times 10^{-5}$ (41)	$2.6 \times 10^{-7}$ (0.7)
Bromacil	$4.6 \times 10^{-7}$ (1.2)	$4.1 \times 10^{-5}$ (98)	$2.5 \times 10^{-6}$ (6)	$1.7 \times 10^{-6}$ (4)
Dinoseb	$5.0 \times 10^{-6}$ (5.3)	$1.3 \times 10^{-6}$ (1.4)	$3.5 \times 10^{-7}$ (0.4)	$4.4 \times 10^{-7}$ (0.5)
Ioxynil	$6.0 \times 10^{-6}$ (14.6)	$1.6 \times 10^{-5}$ (40)	$2.2 \times 10^{-7}$ (0.5)	$1.6 \times 10^{-6}$ (4)
Nitrasen	$3.4 \times 10^{-6}$ (2.1)	$2.0 \times 10^{-5}$ (13)	$1.7 \times 10^{-4}$ (106)	$4 \times 10^{-6}$ (2.5)

Note) The values in the parentheses are relative resistant ratios(R/S) calculated from the  $I_{50}$  of relative resistant mutants and wild type.

braneo) 저해제의 작용력에 영향을 주는 것으로 생각되었다. 따라서 cyanobacteria에서 분리한 thylakoid membrane을 이용하는 방법이 일회 배양으로부터 많은 thylakoid membrane을 얻을 수 있으며, 또한 약제에 따라 정도는 다르나 고등식물로부터 분리한 chloroplast를 이용한 조사보다는 전자전달저해제에 대한 반응이 민감하여 이의 탐색실험에 보다 적합할 것으로 판단되었다.

Cyanobacteria의 변이주들에 대한 제초제의 반응성을 비교하면(표 3), 먼저 diuron의 경우 D<sub>1</sub> 단백질의 255번 위치와 264번 위치의 아미노산이 각각 leucine과 alanine으로 치환된 Di-22가 표준형(wild type)보다 2,000배의 저항성을 보여준 것과, 동일한 위치가 각각 tyrosine과 alanine으로 치환된 변이주 D-5가 800배 정도의 저항성을 보여준 것은 diuron이 결합하는 D<sub>1</sub> 단백질의 아미노산 위치를 추정할 수 있는 결과였고, atrazine의 경우에는 264번 위치의 아미노산이 glycine으로 치환된 G-264 변이주만이 1,000배 정도의 저항성을 나타내었고, 기타 4 약제의 경우에는 특별한 저항성을 나타내는 변이주가 없었는데 이는 Erickson 등<sup>3)</sup>과 Ohad 등<sup>7)</sup>의 결과와 아주 유사하였다.

따라서 이들 변이주들에 대한 저항성 약제와 비저항성 약제가 동시에 처리될 경우의 반응성을 조사하기 위해서 diuron과 atrazine, diuron과 dinoseb의 동시처리에 의한 상호작용성을 Di-1, Di-22 및 G-264 변이주를 대상으로 조사하였



**Fig. 2.** Sensitivities of the Hill reaction in thylakoid membrane extracted from cyanobacteria as affected by diuron, atrazine and their mixture.

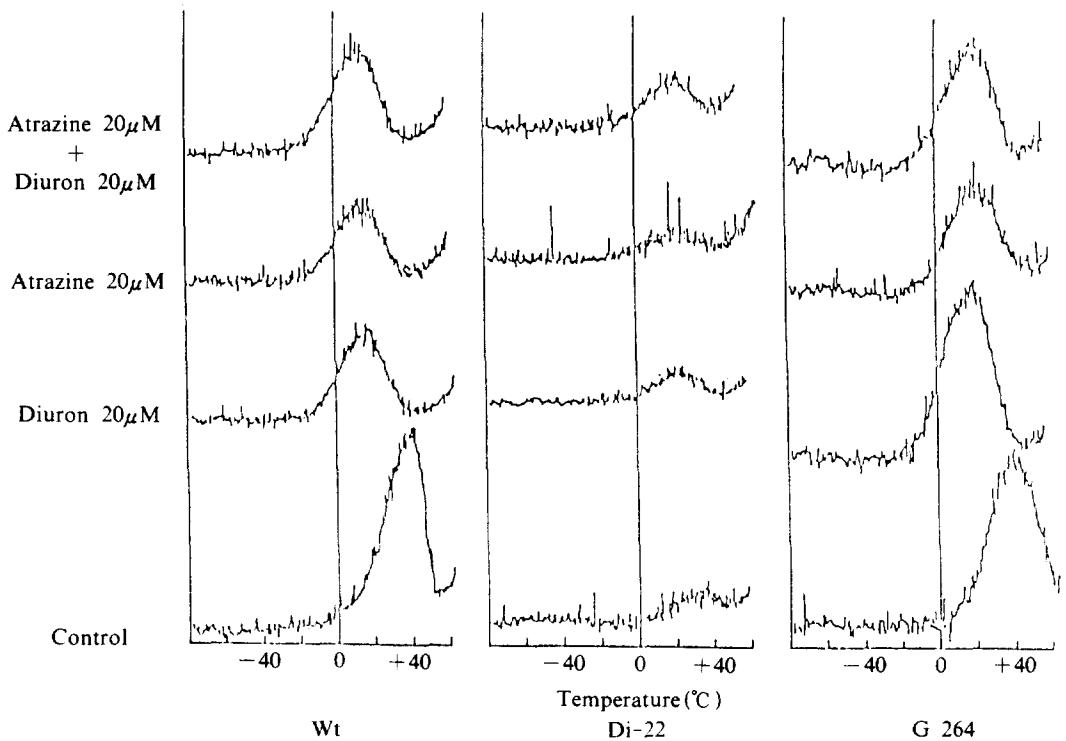


Fig. 3. Effect of diuron ( $20\mu M$ ), atrazine ( $20\mu M$ ), and mixture ( $20\mu M+20\mu M$ ) on the glow curve of isolated cyanobacteria thylakoid membranes. Samples were excited with one flash at  $0^\circ C$ .

다.

먼저 diuron과 atrazine을 동일 농도로 혼합처리한 결과(그림 2) wild type에 대해서는 상호 반응성이 크게 나타나지 않았고 저해활성이 강한 diuron의 단독처리에 의한 활성과 비슷한 경향을 보였으며, Di-22와 Di-1 변이주에 대해서는 약한 반응성을 보이면서 저해활성이 강한 약제의 단독처리 효과보다 다소 활성이 낮아졌으나, 변이주 G-264에 대해서는 혼합처리에 의한 저해활성이 각 약제를 단독처리한 저해활성의 중간치를 나타내어서 혼합처리에 의한 상호작용성이 현저하게 관찰되었다. 세종류의 변이주에 대해서 혼합처리의 상호반응성을 비교할 때 G-264가 가장 강했고, 다음으로 Di-1, D-22로서 나타났는데 이들 변이주들의 공통점인 264번 위치의 아미노산이 치환된 점으로 미루어 볼 때, 혼합처리에 의한 상호작용은 264번 위치에서 경합적으로 작용할 가능성을 시사한 결과였고, serine와 alanine으로 치환된 Di-1과 Di-22보다는

glycine으로 치환된 G-264에서 더욱 크게 나타났다. 이는 Van Assache와 Carles<sup>8)</sup>가 atrazine과 diuron은 chloroplast에서 상호 경합적으로 작용한다고 하였던 내용을 설명할 수 있는 결과였다. 이러한 결과를 확인하기 위해서 thermoluminescence band<sup>9)</sup>를 조사하였다(그림 3). 그러나 혼합처리에 의한 thermoluminescence band의 변화는 구별할 수 없었다. 다음으로는 diuron과 dinoseb의 혼합처리에 의한 반응성을 조사한 결

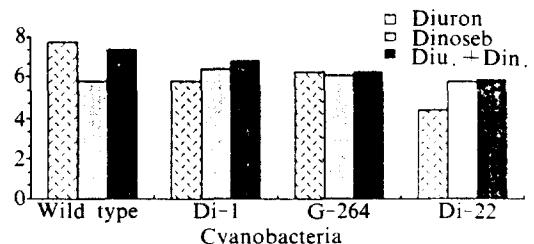


Fig. 4. PI-50 of the Hill reaction in thylakoid membrane extracted from cyanobacteria as affected by diuron, dinoseb, and mixture.

과(그림 4) wild type에 대해서는 diuron보다 조금 낮게 나타났고, 변이주 G-264에 대해서는 dinoseb보다는 높지만 diuron과 비슷한 저해활성을 보여 diuron에 의해 지배되어 나타났으나, 변이주 Di-1에 대해서는 diuron의 단독처리보다 100배, dinoseb보다 3배 정도 높은 저해활성을 나타내었다. 또한 변이주 Di-22에 대해서는 diuron 보다 1,000배, dinoseb보다 2배 정도의 높은 저해활성을 보여 혼합처리에 의해 저해활성이 급격하게 증대되었다. 혼합처리에 의해 저해활성이 증가되었던 변이주 Di-1과 Di-22는 diuron에 대해서 저항성을 보여 이들의 치환부위가 diuron의 결합부위로서 중요하게 생각되고 있는데, D<sub>1</sub> 단백질의 구성 아미노산 중에서 255번 위치가 치환되거나(Di-1), 255번 위치 및 264번 위치가 동시에 치환되어(Di-22) diuron의 단독처리에 저항성을 나타냈던 이들 변이주들이 dinoseb과 혼합처리를 함으로써 전자전달반응이 크게 억제된 것은 dinoseb이 변이주 Di-1과 Di-22에 대해서 저항성을 나타내지 않았던 점으로 미루어 보아 직접적인 관련은 적을 것으로 생각되며, 혼합처리된 dinoseb이 diuron과 서로 다른 결합부위를 가지고 있어서 경합적인 반응을 하지 않고 독립적으로 작용하여 전자전달 저해활성이 증가되었거나, 저항성을 유기하는 255번 또는 255번과 264번 위치의 아미노산과 diuron 사이에서 교량적 역할을 하여 diuron의 결합을 유도하였을 가능성을 시사해 주는 결과였다. 이와 같이 단독처리효과와 혼합처리효과에 의해서 전자전달반응 저해활성이 변화되는 것은 결합부위에 대한 또 다른 중요한 자료라 생각되며 이러한 방향에서 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 이상과 같은 방법을 통하여 새로운 제초제의 탐색을 위한 스크리닝이 진행된다면 보다 빠르고 합리적인 광합성 전자전달저해제의 개발이 가능하게 될 것으로 보이며, 다른 작용기작에 관련된 biorational screening도 시도될 수 있으리라 생각된다.

## 적  요

광합성 전자전달저해제의 탐색을 위한 bior-

ational screening 방법으로 광합성 박테리아의 일종인 cyanobacteria의 표준형과 D<sub>1</sub>단백질의 구성 아미노산이 변환된 변이주 Di-1, G-264, Di-22, TRY-5를 사용하여 기존 약제의 혼합효과와 몇가지 합성화합물의 Hill반응 저해활성을 측정 조사하였고, 또한 시금치로 부터 분리한 chloroplast와 cyanobacteria로 부터 분리한 thylakoid membrane에 대한 기존 제초제의 반응성을 조사하였다.

1. 광합성억제형 제초제에 대한 반응성 비교에서 cyanobacteria로부터 분리한 thylakoid membrane이 시금치로 부터 분리한 chloroplast보다 약제에 대하여 민감한 반응을 나타내어 광합성 전자전달저해제의 탐색을 위한 재료로 보다 적합하였다.
2. Diuron에 대하여 wild type보다 Di-22와 D-5 변이주는 각각 약 2,000배와 800배의 저항성을 나타내었고 atrazine에 대하여는 G-264 변이주만이 약 1,000배의 저항성을 나타내었으며, 기타 네 약제에 대하여는 뚜렷한 저항성을 나타내는 변이주가 없었다.
3. D<sub>1</sub> 단백질의 264번 위치의 serine이 다른 아미노산으로 치환된 Di-1과 D-22 및 G-264 변이주에 대한 diuron과 atrazine의 혼합처리효과를 검토한 결과 상호 경합적으로 작용하였으며 그 정도는 G-264 변이주에 대해서 가장 뚜렷하게 나타났다. 그러나 diuron과 atrazine의 혼합처리에 의한 thermoluminescence band의 변화는 인정할 수 없었다.
4. 변이주 Di-1과 D-22는 dinoseb에 대해서 저항성을 나타내지 않았으나, dinoseb과 diuron의 혼합처리시 diuron에 대한 저항성이 크게 약화되었다.

## 인  용  문  현

1. Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24 : 1-15.
2. Castenholz R.W. 1988. Culturing method for Cyanobacteria. pp.68-92, in Lester Packer, Alexandria N. Glazer ed,

- "Methods in enzymology" Vol.167, Academic Press.
3. Erickson J.M., K. Pfister, M. Rahire, R. K. Togasaki, L. Mets, and J.D. Rochaix, 1989. Molecular and biophysical analysis of herbicide-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: Structure-function relationship of the photosystem II D<sub>1</sub> polypeptide. *Plant Cell* 1 : 361-371.
  4. Fuerst E.P., C.J. Arntzen, K. Pfister, and D. Penner, 1986. Herbicide cross-resistance in triazine-resistant biotypes of four species. *Weed Sci.* 34 : 344-353.
  5. Inoue Y., and K. Shibata. 1979. Thermoluminescence from the oxygen-evolving system in photosynthesis. *Trans Biochim. Sci.* 4 : 182-184.
  6. Katoh S. 1981. "Method in Photosynthesis Research," ed by S. Katoh, S. Miyaji and Y. Murata, Kyoritsu Shuppan Inc., Tokyo, pp.251-253.
  7. Ohad N., D. Amir-Shapira, H. Koike, Y. Inoue, I. Ohad, and J. Hirschberg. 1990. Amino acid substitutions in the D<sub>1</sub>-protein of photosystem II affect Q<sub>B</sub>-stabilization and turnover of D<sub>1</sub>. *Z. Naturforsch* 45C : 402-408.
  8. Van Assche C.J. and P.M. Carles. 1981. Photosystem II inhibiting chemicals (Molecular interaction between inhibitors and common target) *Pestic. Biochem. Physiol.* 15 : 1-21.
  9. Vass I., G. Horvath, T. Hweczeg and S. Demeter. 1981. Photosynthetic energy conservation investigated by thermoluminescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 634 : 140 -152.
  10. 光山 弘一. 1989. 光合成電子傳達阻害型除草剤. 日本農藝化學會誌 63(10) : 1622 -1624.