

***Synechocystis* sp. PCC6803을 이용한 Photosystem I⁻ mutants의 색소 및 틸라코이드막 단백질 분석**

전 은 경 · 장 남 기
서울대학교 생물교육과

Analysis of Pigments and Thylakoid Membrane Proteins in Photosystem I⁻ Mutants from *Synechocystis* sp. PCC6803

Jeon, Eun Kyung and Nam-Kee Chang

Dept. of Biology Education, Seoul National University

ABSTRACT

Pigments and thylakoid membrane proteins were investigated in wild type and PS I⁻ mutants from *Synechocystis* sp. PCC6803. Comparing morphological features, B2 was less fluorescent than the other strains. The contents of chlorophyll a were propotional to the FNR activity in thylakoid membrane. The FNR activity of mutants was lower than that of wild type. In the result of pigments analysis, mutants had smaller cholophyll a than that of wild type. The major carotenoid was found to be β -caroene, but zeaxanthin was barely detected in thylakoid membrane of mutants.

The polypeptide, 14.8kD was detected by electrophoresis in mutants. It was considered to be the modification of 15.4kD in wild type. Membrane polypeptides of 17.6 and 19.7kD were not detected in mutants. In the result of western blotting, subunit I was detected in all strains, but subunit II was barely detected in mutants. Subunit II was not detected in B2 at all.

In view of the results so far achieved, the changes of contents of chlorophyll and zeaxanthin were affected by the defficiency or modification of functional domain in subunit I. Also the modification in subunit I affected the subunit II- binding site in PS I. As the result, efficiency of photosynthesis was decreased.

Key words: *Synechocystis* sp. PCC6803, PS I⁻ mutant, Photosynthetic efficiency, Pigment, Thylakoid membrane proteins, Subunit I, II.

서 론

광합성은 틸라코이드막에 존재하는 photosystem I (PS I)과 photosystem II (PS II)를 시작으로 이루어진다. PS II는 물에서 전자를 분리하여 전자전달계를 통하여 PS I에 전달해 주고, PS I은 이 전자를 다시 산화환원 전위가 낮은 수용체인 NADP⁺로 전달하여 환원시킨다. 그

리고 이러한 과정에서 생기는 전기화학적인 구배에 의하여 ATP가 합성된다.

PS II에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다. PS II의 반응중심은 색소와 단백질의 복합체이고 약 6개의 단백질로 구성되어 있다(Pakasi *et al.*, 1988; Philbrick *et al.*, 1988). 이 중 core protein은 cyanobacteria와 고등식물간에 매우 큰 유사성을 나타낸다. 최근 PS II의 구조는 purple bacteria의 연구에서 자세히 밝혀졌다(Deisenhofer *et al.*, 1985; Michel and Deisenhofer, 1988).

한편 PS I은 9개 이상의 단백질로 되어 있음이 보고되었다(Suhller, 1989). Core protein complex는 두개의 82-83kD의 subunit로 구성되어 있으며 매우 유사한 특징을 나타내고 있다. 이 복합체는 엽록소와 카로티노이드와 같은 색소들의 결합장소이며 나머지 다른 subunit들과 결합하고 있다. 그러나 이에 대한 자세한 구조는 현재 연구 중에 있으며, 단지 PS I이 대칭적인 구조로 되어 있다고 알려져 있다(Ford and Holzenburg, 1988; Witt *et al.*, 1987).

광합성 생물에 존재하는 색소는 크게 엽록소와 카로티노이드를 들 수 있다. 이 중 대부분을 차지하고 있는 엽록소는 빛을 흡수하는 기능을 하며, 특히 엽록소 a는 반응중심에서 빛에너지를 전자에너지로 변환시키는 중요한 기능을 수행한다.

Cyanobacteria에서는 엽록소 a가 반응중심 색소로 그 기능을 수행하며, 고등식물과는 달리 엽록소 b는 존재하지 않는다(Parson, 1982). 그 밖에 카로티노이드는 순수 탄화수소인 carotene과 산소를 포함하는 탄화수소인 xanthophyll로 구별된다. 카로티노이드의 기능은 광에 의한 photooxidation을 방지하고 엽록소처럼 활성화 에너지를 전달시키는 것으로 알려져 있다(Harms, 1987). β -carotene은 lutein이나 다른 xanthophyll보다는 반응중심에서 에너지를 전달하는데 더욱 효과적이며, 이와 유사한 관계를 지닌 색소로서 xanthophyll의 일종인 fucoxanthin 및 peridinin이 에너지 전달에 높은 효율을 나타낸다고 보고되었다(Rowan, 1989). 대부분의 식물에서는 β -carotene이 가장 풍부한 카로티노이드로 존재한다. Cyanobacteria에서 PS I에 엽록소의 90%, 카로티노이드의 90%, phycocyanin의 15%가 존재한다고 보고되고 있다(Carr and Whitton, 1982).

대부분의 색소는 단백질과 비공유결합되어 광을 흡수하는 기능을 수행한다. 최근 색소와 결합하고 있는 특정 단백질을 알고자 하는 연구가 이루어지고 있다. 엽록소와 결합하는 단백질로는 10개의 단백질이 현재 알려져 있으며, 카로티노이드와 결합하고 있는 단백질은 4개의 단백질이 동정되어 보고되었다(Vainstein *et al.*, 1989; Bassi *et al.*, 1990).

이러한 결합단백질은 색소와 밀접한 관계를 가지고 있다(Romer *et al.*, 1990; Kotzabasis *et al.*, 1989). 최근 Chl b mutant에서 연구된 결과에 의하면 광합성 색소와 단백질과의 상호작용이 복합체의 macrodomains의 형성에 영향을 미친다고 보고되었다(Garab, 1991).

많은 증거들이 고등 식물의 색소 단백질 복합체가 cyanobacteria와 유사함을 나타낸다(Rusckowski, 1980). 이러한 색소 단백질 복합체는 막을 통과하여 기질에 파묻혀 있다는 모델에 제시되고 있다(Guikema, 1983). 그러나 아직도 색소단백질 복합체의 결합에 대한 확실한 정설은 없다.

따라서 본 연구에서는 실험재료로 cyanobacteria인 *Synechocystis* sp. PCC6803의 PS I을 불활성화시켜 만든 돌연변이주를 이용하였다. 이러한 돌연변이주는 wild type의 blue-green color와는 다른 blue, green, orange, Yellow color를 띠는 mutant들이 생성되었다. 이러한 결과를 해석해 볼 때, 광합성 기구의 구조적 성분들의 변화는 광합성 색소의 함량변화를 수반함을 알 수 있다. PS I에서는 PS II보다 색소와 결합하는 정도가 크다고 알려져 있음을 고려하여, PS I

이 불활성화된 mutants에서 주요 색소인 엽록소와 카로티노이드를 분석하여 이에 따른 막단백질의 변화를 비교 연구하였다. 그리고 *psaB* gene product에서 mutagenesis로 인한 이상이 예상되기 때문에 이들 subunit가 틸라코이드 막에서 정상적으로 결합하는가를 확인하기 위하여 Western blotting 방법을 이용하여 subunit I, II의 발현 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. Strain

Synechocystis sp. PCC6803 wild type과 PS I⁻ mutant strain인 B2, G1, G3, G4를 실험재료로 사용하였다. PS I⁻ mutants는 *Synechococcus* sp. PCC 7002의 *psaB* gene 사이에 chloramphenicol acetyl transferase(CAT) gene이 삽입된 유전자를 catridge mutagenesis의 방법으로 *Synechocystis* sp. PCC 6803에 삽입하여 만들어진 strain이다(Kim *et al.*, 1992).

2. 배양 조건

세포의 배양은 Kratz 등 (1955)의 방법과 Jurgens 등(1985)에 따라 수행하였다. Plate culture는 BG-11과 1.5%의 agar상에서 배양하며, liquid culture는 glucose 1.0~3.0%가 첨가된 media C에서 배양하였다. Cell harvesting은 OD₇₂₀의 값이 1.0정도일 때 수행하였다. PS I⁻ mutant일 경우에는 chloramphenicol(Cm) resistant하므로 배지에 Cm을 5mg/L 정도가 되게 첨가하여 배양하였다.

3. 막의 분리

막의 분리는 Omata 등 (1983)의 방법과 Bullerjahn 등(1986)의 방법을 변형하여 수행하였다. 세포를 수확한 후, 50mM Hepes /30mM CaCl₂ 완충용액(pH 7.5)으로 세척하고 French pressure로 3회 실시하여 세포를 깨뜨렸다. 이때의 압력은 15,000 psi이다. 32,000g로 1시간 동안 원심분리하여 수확된 세포를 sucrose step gradient를 만들어 그 위에 loading하였다. Step gradient는 가장 아래쪽에 80% sucrose 2ml을 넣고, 그 위에 60% sucrose 3ml, 50% sucrose 3ml, 맨위에 39% sucrose 2ml을 넣어 준비하였다. 세포를 loading한 후 130,000g로 16시간 동안 원심분리하여 틸라코이드막을 분리하고, 이를 50mM Hepes /30mM CaCl₂로 세척하고 32,000g로 1시간 동안 원심분리하여 sucrose를 제거하였다.

4. 단백질 정량

각 시료의 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 하여 Lowry 등 (1951)에 따라 A₆₄₀에서 측정하였다.

5. 틸라코이드막의 FNR(ferredoxin-NADP reductase) 활성도 변화

Schwartz 등 (1966)의 방법과 Allen(1974)의 방법으로 측정하였다. 50mM Tris, 100μM potassium ferricyanide reaction 완충용액 2ml을 spectrophotometer에 넣은 후 시료 50μl를 넣는다. 20 μl NADPH⁺를 첨가한 후 A₄₂₀에서 측정하였다. Ferricyanide의 extinction coefficient는 1.0(mM.cm)⁻¹이다.

6. Thin-layer chromatography

색소의 추출은 Omata 등 (1983)의 방법을 이용하여 95% acetone과 methanol로 voltexing과 ice에서의 incubation을 3번 이상 반복하여 추출하였다. 색소의 분리를 위한 thin-layer chromatography는 Hager 등 (1966)의 방법과 Bullerjahn 등 (1986)을 변형하여 수행하였다. TLC는 silica gel을 입힌 Art 5n35를 사용하였으며, 용매는 isooctane : 2-propanol(16:1 vol/vol)을 사용하였다. 이 모든 과정은 어두운 곳에서 수행하였다. 분리가 끝난 후 즉시 용지는 액체 질소에 넣어 색소의 산화와 탈색을 방지하였다. 분리된 band는 굵어 적당한 용매(chlorophyll, xanthophyll, echinenone은 acetone; zeaxanthin은 ethanol; β -carotene은 n-hexane)에 넣고 원심분리(5000g)를 2분 실시하여 silica gel을 제거하였다. 각 색소의 동정은 Rf값 및 흡수 스펙트럼 패턴으로 확인하였고, 정량은 Jensen 등 (1959)과 Hager 등 (1970)의 방법에 따라 최대 흡수파장에서의 흡수도로 측정하였다. 카로티노이드의 최대 흡수파장에서의 extinction efficient는 xanthophyll이 2160(Goodwin, 1976), zeaxanthin이 2480(Davies, 1976), echinenone이 2340, β -carotene은 2592이다. 엽록소는 Jaffrey 등 (1968)의 방법에 따라 A_{668} 에서 측정하여 정량하였다.

7. 전기 영동에 의한 단백질의 분리

전기 영동은 Laemmli의 방법(1970)에 따라 LDS PAGE를 수행하였다. Stacking gel과 resolving gel 그리고 reservoir buffer는 SDS대신 LDS로 교체한다. Stacking gel은 5% acrylamide로 하며 resolving gel은 12.5%를 이용하였다. Gel loading sample의 준비는 위 과정에서 얻어진 시료에 sample buffer를 1:1 비율이 되게 더한 다음, loading하기 전에 약 1분 동안 끓여 이를 최종 시료로 하였다. Gel running은 4°C에서 수행하며 전압은 4W/mm로 약 12시간 정도 수행하였다. 단백질의 발현 정도는 gel scanner(pharmacia)를 이용하여 비교 분석하였다.

8. 분리된 막단백질에서 subunit I, II 발현의 동정

이는 Chithis 등 (1989)의 방법에 의하여 수행하였다. 분리된 틸라코이드 막단백질에 subunit I, II의 항체를 이용하여 alkaline phosphatase의 활성도로 조사하였다. 위 과정에서 얻어진 gel 상에서의 단백질을 PVDF 막으로 옮긴다. 이는 39mM glycine, 48mM Tris, 0.037% SDS, 20% methanol로 구성된 transfer 완충용액을 사용하여 상온에서 수행하였다. 전류는 0.65mA/cm²으로 일정하게 걸어주며 시간은 약 1.5~2시간 정도로 한다. 이후 PVDF 막을 상온에서 약 30~60분 정도 건조시킨 후, 제 1차 antibody와 반응시킨다. 이때, blocking solution과 함께 약 2시간 동안 반응을 시키는데 4°C에서 천천히 반응시킨다. 반응이 끝난 PVDF 막을 다시 PBS solution 250ml로 3회 정도 세척한다. 이때 시간은 1회당 약 10분 정도로 한다. 이 PVDF 막은 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl(pH7.5) 용액 200ml로 10분 동안 incubation시켜서 azide와 phosphate 성분을 제거시킨다. 효소와 연결되어 있는 제2차 antibody와의 결합은 phosphate와 azide가 없는 blocking soln.에서 반응시킨다. 이때 antibody의 최종 농도는 0.5~5.0 μ g/ml로 한다. 반응은 상온에서 약 1시간 정도 하며 천천히 흔들어준다. 이 PVDF 막은 다시 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl(pH7.5) 200ml로 상온에서 10분 정도 incubation한다. 이 과정을 3회 정도 반복한다. Subunit I, II의 동정은 alkaline phosphatase로 하며 기질로 BCIP/NBT를 사용한다. 기질용액은 우선 NBT stock soln. 66 μ l와 alkaline phosphatase 완충용액 10ml, BCIP

stock soln. 33 μ l를 더하여 만든다. 이 기질 용액을 0.1ml/cm² PVDF 막이 되게 만든 다음 상온에서 반응시킨다. Band가 나타나면 PVDF 막을 0.5M EDTA(pH7.0) 200 μ l, PBS soln. 50ml로 세척한다.

결 과

1. 형태의 관찰

광학현미경과 형광현미경을 이용하여 *Synechocystis* sp. PCC6803의 wild type(Wt)과 4종의 mutants(B2, G1, G3, G4)를 관찰하였다. 광학 현미경 \times 1,000 배율로 관찰한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 각 strains의 색을 비교해 볼 때, Wt, G1, G3, G4는 비슷한 청록색을 띠었으나, 이와는 대조적으로 B2는 황록색을 띠었다. Strains의 크기는 Wt이 약 2.5 μ m이며, G1, G3, G4 strain도 이와 유사하였다. 그러나 B2는 이보다 약간 작았다.

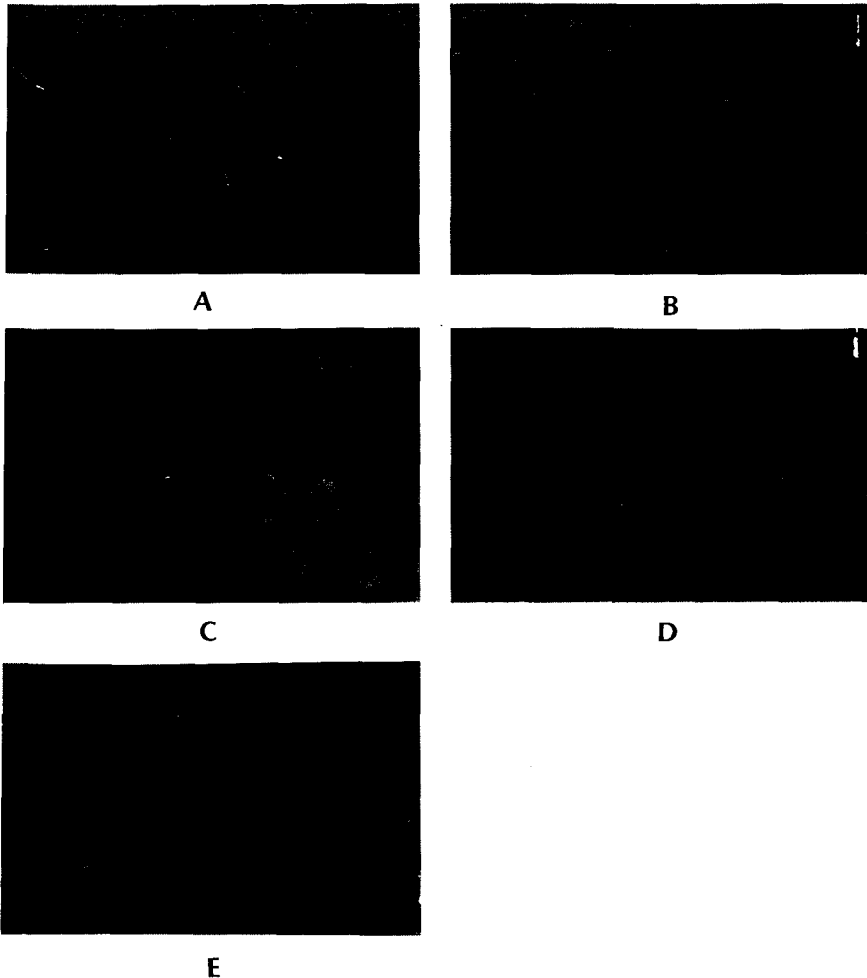


Fig. 1. Light micrographs of wild type(Wt) and PSI mutants from *Synechocystis* sp. PCC 6803. Strains are (A) Wt (B) B2 (C) G1 (D) G3 (E) G4. Bar represents 10 μ m.

형광현미경($\times 400$)으로 관찰한 각 strain의 특징은 Fig. 2에 나타내었다. G3, G4는 Wt과 비슷한 형광을 나타내었으나 G1은 이보다 약한 형광을 띠었다. 특징적으로 B2는 형광을 거의 띠지 않는 것으로 나타났다.

2. 막의 분리

Synechocystis sp. PCC6803의 wild type(Wt)과 4종의 mutants(B2, G1, G3, G4)의 막을 Ultra centrifuge로 분리한 결과 모든 strain에 5개의 띠가 분리되었다(Fig. 3). Omata와 Murata(1983)의 보고와 비교해 볼 때, 다섯번째 띠는 푸른색을 나타내는 phycocyanin이며, 네번째 띠는 자색의 phycoerythrin이다. 세번째 띠는 갈색을 띠는 세포막이며, 두번째 띠는 녹색의 틸라코이드막이다. 가장 아래의 띠는 세포벽으로 밝혀졌다. B2 strain에서 각 띠의 색은 다른 strain에서 보다 약하게 나타났다.

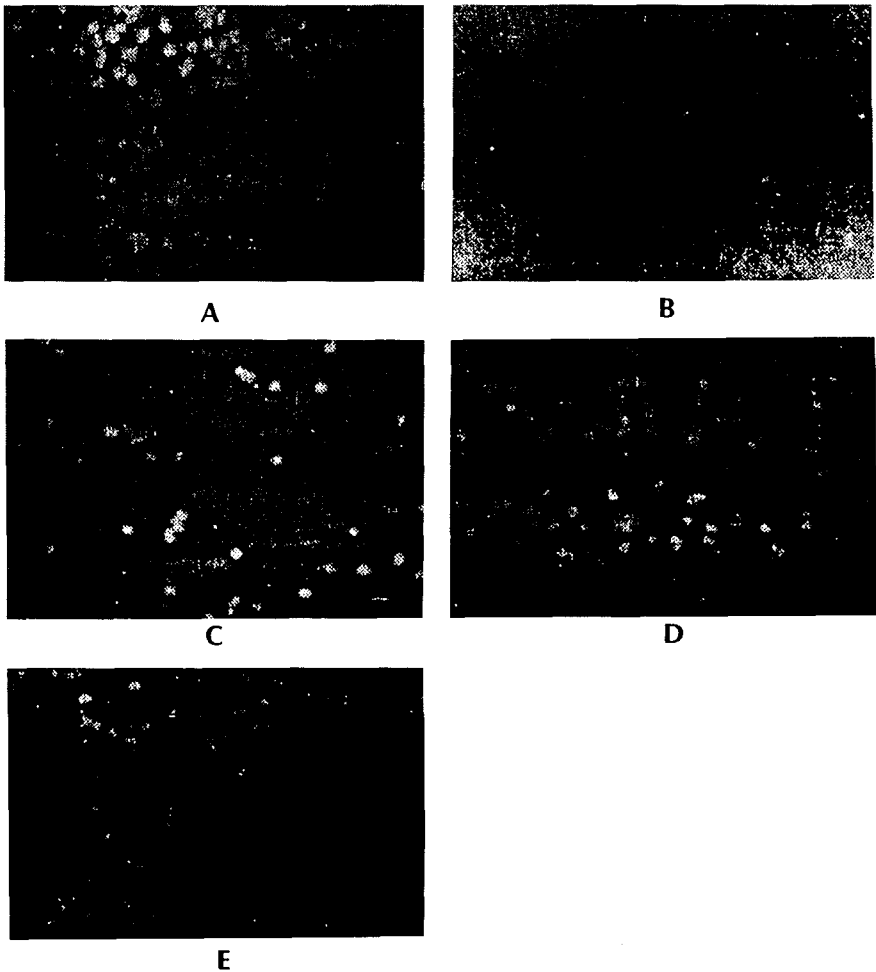


Fig. 2. Fluorescence micrographs of wild type(Wt) and PSI mutants from *Synechocystis* sp. PCC 6803. Stains are (A) Wt (B) B2 (C) G1 (D) G3 (E) G4. Bar represents 25 μ m.

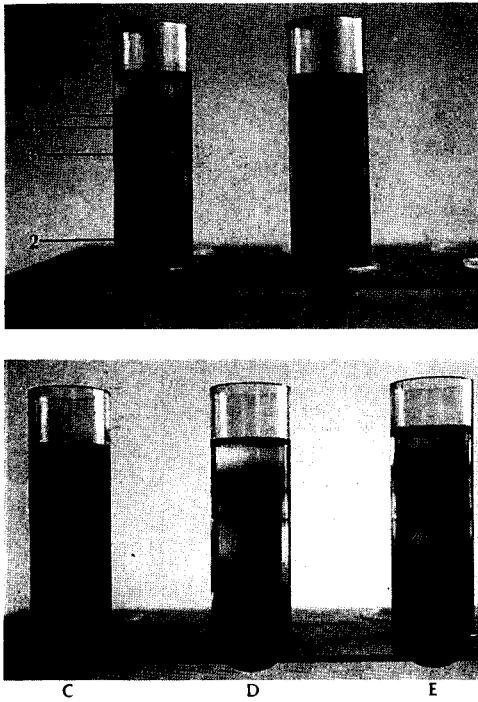


Fig. 3. The separations of the membrane fractions by ultracentrifugation. Strains are (A) Wt (B) B2 (C) G1 (D) G3 (E) G4. Bands are (1) cell wall (2) thylakoid membrane (3) cell membrane (4) phycoerythrin (5) phycocyanin.

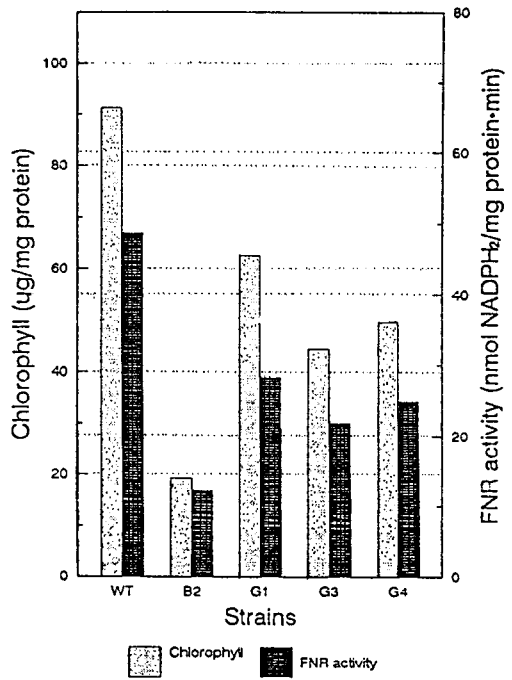


Fig. 4. Histogram of chlorophyll content and FNR activity of thylakoid membrane in wild type(Wt) and PSI mutants from *Synechocystis* sp. PCC 6803.

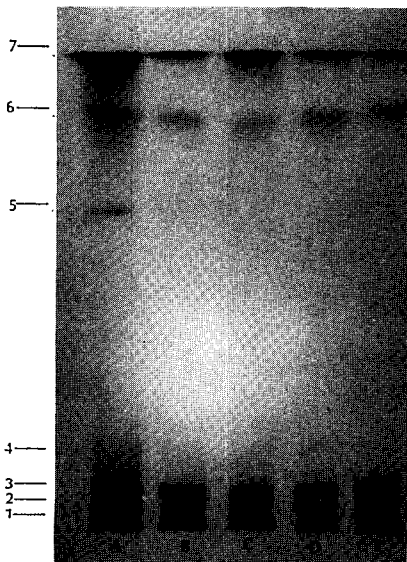


Fig. 5. Thin-layer chromatography of pigments in thylakoid membrane on silica gel plates in the solvent: isooctane:2-propanol, 16:1 (vol/vol). Strains are (A) Wt (B) B2 (C) G1 (D) G3 (E) G4. Pigments are (1)(2)(3) xanthophyll (4) chlorophyll a (5) zeaxanthin (6) echinenone (7) β -carotene.

3. 틸라코이드막의 엽록소의 양 및 FNR의 활성도 변화

Synechocystis sp. PCC6803의 wild type(Wt)과 4종의 mutants(B2, G1, G3, G4)내 틸라코이드막의 엽록소의 양 및 FNR의 활성도 변화를 측정하였다. 엽록소의 양은 Wt에서 91.25 μ g chl/mg protein으로 가장 크게 나타났다. PSI⁻ mutant에서는 G1, G4, G3, B2의 순으로 각각 65.24, 49.70, 44.47, 19.18 μ g chl/mg protein으로 Wt보다는 적은 양이었다. FNR 활성도는 Wt에서 48.71nmolNADPH₂/mg protein min을 나타내었으며 PSI⁻ mutant에서는 이보다 작은 활성도를 보였다. 각 PSI⁻ mutant에서는 G1, G4, G3, B2의 순으로 각각 28.26, 24.92, 21.81, 12.24nmolNADPH₂/mg protein min으로 나타났다. 이 실험결과 엽록소의 양에 비례하여 FNR의 활성도가 나타나는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

4. 색소의 분리 및 특성

1) 틸라코이드막의 색소 분석

Synechocystis sp. PCC6803의 wild type(Wt)과 4종의 mutants(B2, G1, G3, G4)내 틸라코이드막의 색소를 TLC(thin layer chromatography)로 분석한 결과, 모두 7개의 bands를 분리하였다(Fig. 5). 분리된 각 색소의 동정은 Jensen(1959)과 Hager(1970)에 따라 Rf값과 흡수스펙트럼 패턴을 비교하여 수행하였다. Band 1, 2, 3은 xanthophyll, Band 4는 녹색의 엽록소 a이며, Band 5, 6, 7은 각각 zeaxanthin, echinenone, β -carotene으로 동정되었다. 특히하게도 band 5의 zeaxanthin은 Wt과는 달리 PSI⁻ mutant에서는 잘 구별되지 않았다. 분리된 각 색소의 양은 Wt을 기준으로 Table 1에 백분율로 나타내었다. Wt에 비하여 PSI⁻ mutant에서는 카로티노이드의 함량이 적으며, 특히 zeaxanthin의 함량은 큰 차이를 나타내었다. 각 strain내에서 카로티노이드의 상대적 분포는 Fig. 7에 나타내었다. 공통적으로 β -carotene의 비율이 가장 크며, 그 다음은 xanthophyll의 비율이 크게 나타났다.

2) 분리된 색소의 스펙트럼 분석

앞에서 분리된 색소의 스펙트럼 양상을 조사하여 Fig. 6에 나타내었다. A는 xanthophyll로 약 430~485nm에서 흡수도가 크게 나타났으며, B는 엽록소 a로서 약 438nm, 670nm에서 최대 peak를 나타내었다. C는 zeaxanthin으로 415~420nm 정도에서 흡수도가 크며, D는 echinenone으로 500~510nm 정도에서 최대 흡수도를 보였다. 마지막으로 E는 β -carotene으로 490~500nm 정도에서 최대 흡수도를 나타내었다. 각 색소의 최대 흡수파장은 Rowan(1990)의

Table 1. Percent distribution of pigments in thylakoid membrane of PSI mutants from *Synechocystis* sp. PCC6803 with respect to the wild type

Pigments	Distribution of pigments (% Wt)			
	B2	G1	G3	G4
β -carotene	95.61	97.33	98.64	99
Echinenone	76.43	72.05	70.08	82.67
Zeaxanthin	0.3*	0.2*	0.2*	0.1*
Xanthophyll	82.56	46.23	38.04	42.67
Chlorophyll a	21.03*	68.54	48.74	54.47

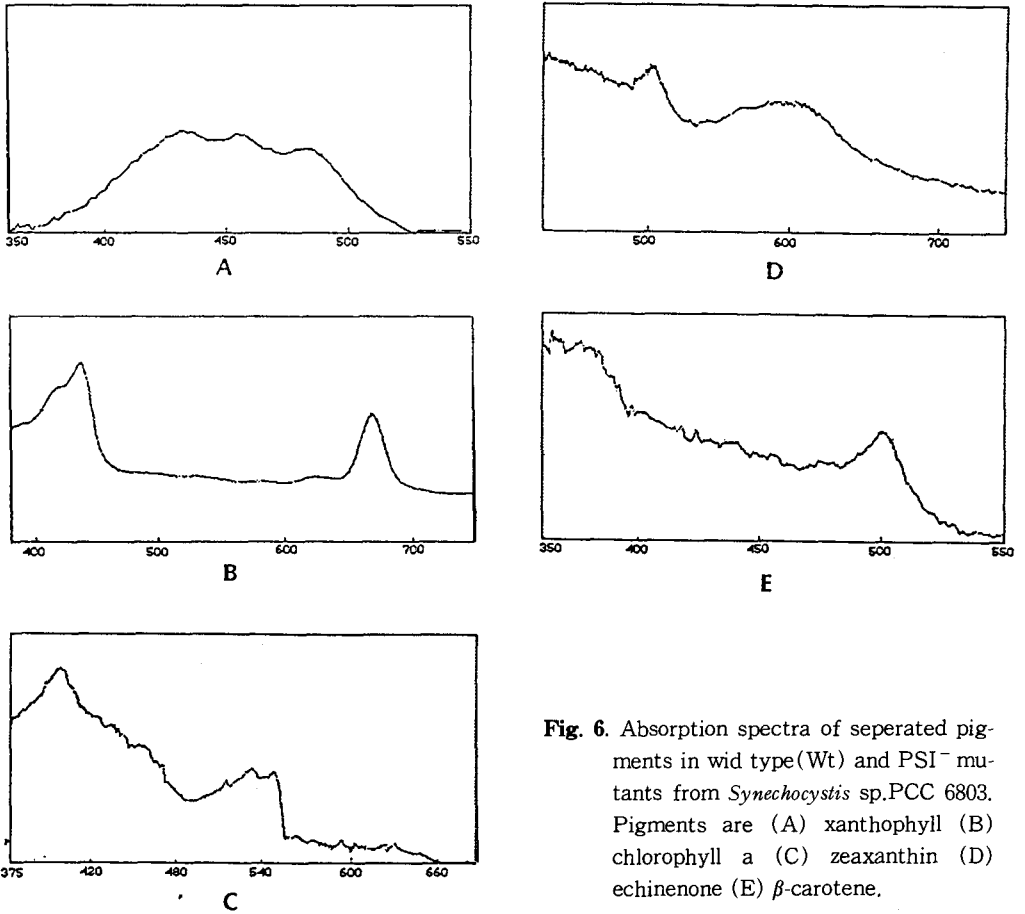


Fig. 6. Absorption spectra of separated pigments in wild type (Wt) and PSI⁻ mutants from *Synechocystis* sp. PCC 6803. Pigments are (A) xanthophyll (B) chlorophyll a (C) zeaxanthin (D) echinenone (E) β -carotene.

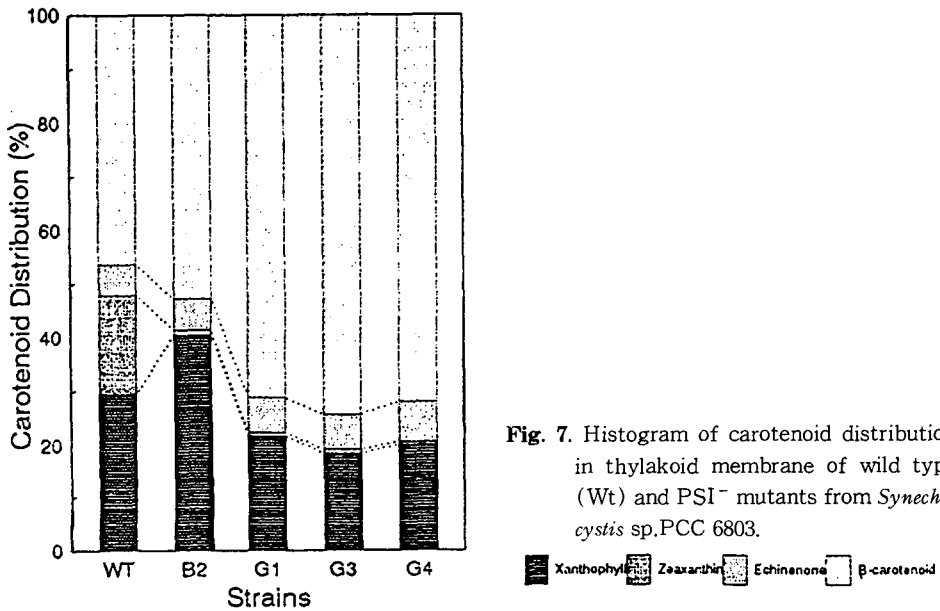


Fig. 7. Histogram of carotenoid distribution in thylakoid membrane of wild type (Wt) and PSI⁻ mutants from *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Legend: Xanthophyll, Zeaxanthin, Echinenone, β -carotenoid

결과와 일치한다.

5. Thylakoid membrane의 막단백질 분석

Synechocystis sp.PCC6803의 wild type(Wt)과 4종의 mutants(B2, G1, G3, G4)내 틸라코이드 막단백질을 2.5% LDS-PAGE로 분리한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 특징적인 것은 약 17.6,

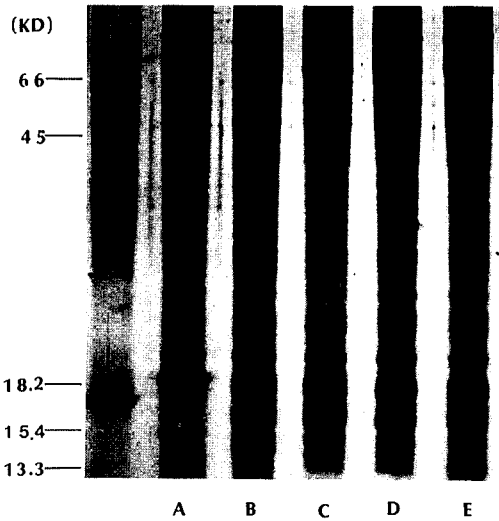


Fig. 8. Polypeptide patterns of thylakoid membranes in wild type(Wt) and PSI⁻ mutants from *Synechocystis* sp.PCC 6803. (A) marker (B) Wt (C) B2 (D) G1 (E) G3 (F) G4.

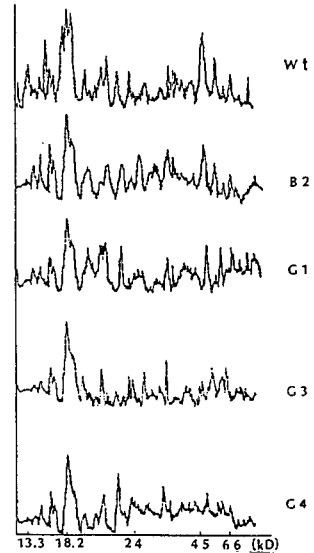


Fig. 9. Densitometer scans of the electrophoretic patterns on thylakoid membrane of wild type(Wt) and PSI⁻ mutants from *Synechocystis* sp.PCC 6803.

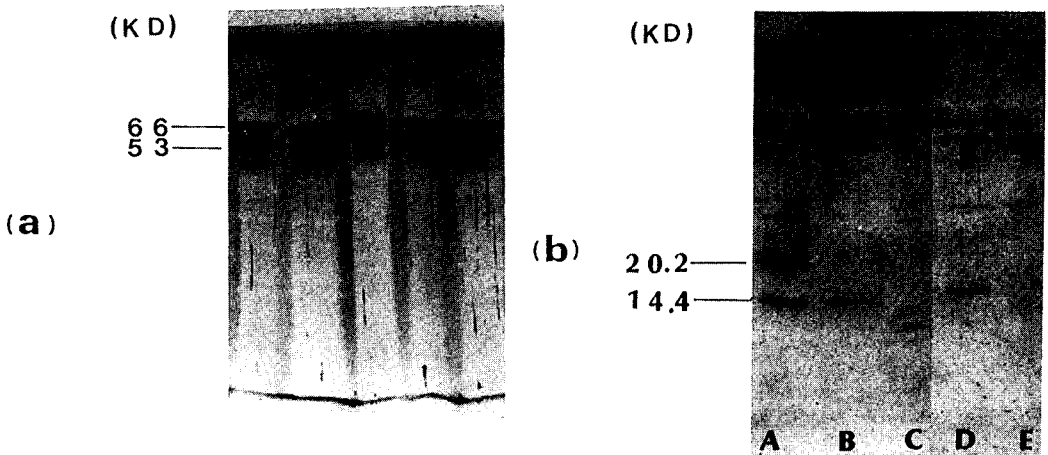


Fig. 10. Immunoblotting of PSI⁻ subunit in thylakoid membrane of wild type(Wt) and PSI⁻ mutants from *Synechocystis* sp.PCC 6803.

(a) Immunoblotting of PSI-subunit I. Strains are (A) Wt (B) G3 (C) G4 (D) G1 (E) B2.
 (b) Immunoblotting of PSI-subunit II. Strains are (A) Wt (B) G3 (C) G4 (D) G1 (E) B2.

18.2, 19.7kD의 세 단백질이 Wt상에서는 나타나나 각 PSI⁻ mutant에서는 약 18.2kD정도의 단백질만 비슷한 양으로 나타났다. 또한 약 13.3, 15.4kD의 단백질은 PSI⁻ mutant에서는 보이지 않았으며, 14.1, 14.8kD 정도의 단백질을 볼 수 있었다. 이러한 차이를 gel scanning하여 각 단백질의 발현 양상을 비교하여 본 결과, 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 9).

PSI complex의 단백질 중에서 subunit I과 subunit II의 발현 정도를 western blotting으로 조사한 결과, subunit I의 발현은 Wt과 마찬가지로 mutants에서도 공통적으로 관찰할 수 있었다(Fig. 10-(a)). 그러나 subunit II의 발현은 그 양상이 다르게 나타났다(Fig. 10-(b)). Mutant에서는 Wt와 다르게 소량이 탐지되었다. 특히 B2에서는 subunit II가 탐지되지 않았다.

논 의

본 연구에서는 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 wild type과 PSI⁻ mutants의 형태적 특성, 색소 및 틸라코이드막의 단백질 발현 양상을 비교하여 보았다.

먼저 각 strain의 형태적인 특성을 광학현미경, 형광현미경으로 분석한 결과 서로 다른 특성을 나타내었다. 특히 B2 mutant는 황록색을 띠며 약한 형광을 나타내었다. 이러한 차이는 각 mutant의 색소함량의 차이로 해석된다.

FNR은 photosystem I의 복합체에 결합되어 있으며 막의 전자전달계의 끝에 존재하는 flavoenzyme이다. 이는 광합성에 의해 생성된 환원력의 평형에 관여하는 효소로 전체적 광합성의 효율을 측정하는데 사용된다. 따라서 틸라코이드막에서 엽록소 a의 양을 정량하고 광합성 효율로서 FNR의 활성도를 조사해 본 결과, 서로 비례적인 관계를 나타내었다. 각 mutant들은 FNR 활성도와 엽록소 a의 함량이 Wt에 비해 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Kim 등(1992)의 보고와 비교해 볼 때, PS I의 기능이 엽록소와 상호 연관되어 광합성 효율을 유지하는 것으로 해석할 수 있다.

일반적으로 색소는 광을 수용하는데 있어서 중요한 기능을 한다. 이는 크게 엽록소와 카로티노이드로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 각 strain의 틸라코이드막의 색소 분포를 분석하여 보았다. 엽록소의 분포는 전체적으로 mutant에서 적게 나타났으며, 주요 카로티노이드는 β -carotene으로 밝혀졌다. Wt과 비교하여 mutants의 카로티노이드 함량이 대체로 적으며 특히 zeaxanthin의 함량이 매우 큰 차이를 나타냈다. 이는 틸라코이드막대에 존재하는 PS I 구조의 변형 또는 결핍이 색소의 결합을 방해하여 degradation을 초래하였다고 추정된다.

색소는 일반적으로 단백질과 결합하여 그 기능을 수행한다. 엽록소와 카로티노이드는 lipophilic하여 막단백질의 소수성 domain에 존재하거나 lipid막의 기질층에 존재한다(Harms, 1985). 현재 광합성 광계 I, II에서 chlorophyll-binding protein이 밝혀졌으며, 또한 돌연변이 연구를 통하여 carotenoid-binding protein이 연구되고 있다(Bassi *et al.*, 1990; Harms, 1985). 최근 *Synechocystis* sp. PCC6714의 실험으로 약 45kD의 carotenoid-binding protein이 동정되었으며(Bullerjahn and Sherman, 1986), Caron and Brown(1987)의 보고에 의하면 약 16~20kD의 색소결합 단백질이 존재한다고 제안하였다. 고등식물에서는 LHC(light harvesting complex)와 CP(core protein)에 대부분의 엽록소와 카로티노이드가 결합되어 있다. Vainstein 등(1989)의 보고에 의하면 PS I에서 색소는 주로 subunit I에 결합되어 있다. 그러나, 아직까지 특정 색소와 결합하고 있는 단백질 및 domain에 대해서는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 mutants의 틸라코이드막을 분리하여, 이를 전기영동 방법에 의해 각 막단백질

들을 분리하였다. 분리된 막단백질 중 mutants에서는 14.8kD가 분리되었다. 이는 wild type의 15.4kD 단백질이 mutagenesis로 인하여 변형되어 나타난 것으로 추정된다. 또한 17.6, 19.7kD의 막단백질들은 mutants에서는 보이지 않았다. 이는 PS I을 구성하는 여러 작은 subunit들이 이와 유사한 낮은 분자량을 나타내는 것으로 볼 때(Golbeck, 1987), PS I의 subunit I의 변형으로 인한 domain의 변화로 여기에 결합하는 small polypeptide가 결핍되어 나타난 것으로 추정된다.

또한 이러한 PS I 결합단백질들의 발현을 알아보기 위해 Western blotting의 방법으로 subunit I, II의 발현을 조사하였다. Subunit I은 wild type 뿐만 아니라 mutants에서도 발견되었다. 그리고 subunit II로 immunoblotting한 결과, 일반적으로 mutants에서는 wild type과 다르게 소량 탐지되었다. 특히 B2에서는 subunit II가 탐지되지 않았다.

본 실험의 연구 결과를 종합하여 볼 때, PS I에서 subunit I의 mutagenesis를 통한 functional domain의 변화는 엽록소와 카로티노이드의 결합을 방해한 것으로 해석된다. 또한 subunit II의 결합에도 영향을 미쳤으리라고 생각된다. 그러나, 여기에 대해서는 immunological study를 통하여 나머지 subunit들의 상세한 변화뿐만 아니라 광합성 색소에 대한 더 자세한 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

Synechocystis sp. PCC 6803의 wild type과 PS I⁻ mutants의 형태적 특성, 색소 및 틸라코이드막의 단백질 발현 양상을 비교하였다. 형태적 특성에서 B2는 황록색을 띠며 약한 형광을 나타내었다. 틸라코이드막에서 엽록소 a의 함량과 FNR의 활성도는 서로 비례적인 관계를 나타내었으며, FNR의 활성도는 mutant에서 공통적으로 낮게 나타났다. 막에 따른 색소 분포를 분석한 결과, 엽록소는 mutant에서 적게 나타났다. 주요 카로티노이드는 β -carotene으로 밝혀졌으며, zeaxanthin은 mutant의 틸라코이드막에서 소량 나타났다.

전기영동으로 mutant에서 14.8kD의 단백질이 분리되었다. 또한 15.4, 17.6, 19.7kD의 막단백질들은 mutant에서 탐지되지 않았다. Western blotting의 결과, subunit I은 모든 strain에서 탐지되었고, subunit II는 mutant에서 소량 탐지되었다. B2에서는 subunit II가 탐지되지 않았다.

결과적으로 mutagenesis를 통한 PS I⁻ subunit I의 functional domain의 변화는 엽록소와 카로티노이드의 분포에 영향을 미치며, subunit II의 결합에도 변화를 일으킨 것으로 사료된다. 이는 전체적으로 광합성 효율에도 영향을 미친 것으로 해석된다.

인용문헌

1. Allen, J. F. and D. O. Hall, 1974. The relationship oxygen uptake to electron transport in photosystem I of isolated chloroplast: the role of superoxide and ascorbate. *Biochem. Biophys. Acta.* 579-585.
2. Bassi, R. and F. A. Wollman, 1990. The chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Plant Physiol.*
3. Bassi, R. and F. A. Wollman, 1990. The chlorophyll a/b proteins of photosystem II in

- the *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*.
4. Bullerjahn, G. S. and L. A. Sherman. 1986. Identification of carotenoid-binding protein in the cytoplasmic membrane from the heterothrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J. of Bacteriology*. 167: 396-399.
 5. Caron, L. and J. Brown. 1987. Chlorophyll-carotenoid protein the heterothrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J. of Bacteriology*. 167: 396-399.
 6. Caron, L. and J. Brown. 1987. Chlorophyll-carotenoid protein complexes from the Diatom, *Phaeodactylum tricorrmutum*: Spectrophotometric, pigment and polypeptide analyses. *Plant Cell Physiol*. 28(5): 775-785.
 7. Carr, N. G. and B. A. Whitton. 1982. *The Biology of Cyanobacteria* 19: 201-202.
 8. Chithis, P. R., P. A. Reilly and N. Nelson. 1989. Insertional inactivation of the gene encoding subunit II photosystem I from cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Biol. Chem*. 264: 18371-18385.
 9. Deisenhofer, J., K. Miki, R. Huber, and H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*. 318: 618-624.
 10. Golbeck, J. H. 1987. Structure, and function and organization of the photosystem I reaction center complex. *Biochemical et Biophysica*. 895: 167-204.
 11. Ford, R. C. Monomeric photosystem I reaction centre complexes. *EMBO J*. 7: 2287-2293.
 12. Grarab, G., J. Kieleczawa, J. C. Sutherland, C. Bustamante and G. Hind. 1991. Organization of pigment-protein complexes into macrodomains in the thylakoid membranes of wild type and chlorophyll b-less mutant of barley as revealed by circular dichorism. *Photochemistry and Photobiology*. 54: 273-291.
 13. Guikema, J. A., and L. A. Sherman. 1983. Chlorophyll-protein organization of membrane from the Cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 220: 155-160.
 14. Hager, A. and B. T. Mayer. 1996 *Planta*. 69: 198-217.
 15. Hager, A. and H. Stransky. 1970. Identification of pigment. *Arch. Microbiol*. 71: 132-163.
 16. Jaffrey, S. W., 1968. *Biol., Bull., Mar. Biol., Lab., Woodshole*, 135: 141148.
 17. Jensen, A. 1959. Quantitative determination of carotene by paper chromatography. *Acta Chem*. 13.
 18. Jurgens, U. J. and J. Weckesser. 1985. Carotenoid-containing outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC6714. *Journal of Bacteriology*. 164: 384-389.
 19. Kim J. S., S. Y. Choi, Y. M. Park, M. D. Abarca, O. Vallon, N. K. Chang and L. Bogorad. 1992. Structural and functional study of photosystem I using Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 mutants. *Photosynthesis Research*. 34: 131.
 20. Kotzabasis, K., M. P. Schuring and H. Senger. 1989. Occurrence of protochlorophyll and its phototransformation to chloraphyll in mutant C-2A' of *Secnedesmus obliquus*.

- Physiologia. Plantarum. 75: 221-2262.
21. Laemmli, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
 22. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent J. Biol. Chem. 193: 265-29624.
 23. Michel, H. and J. Deisenhofer. 1988. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochemistry. 27: 1-7.
 24. Omata, T. N. Murata. 1983. Isolation and characterization of the cytoplasmic membranes from the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. Arch Microbiol. 139: 113-116.
 25. Pakasi, H. B., J. Williams and C. J. Arntzen. 1988. Targeted mutagenesis of the psbE and psbE genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b in photosystem II. EMBO J. 7: 325-332.
 26. Parson W. W. 1982. Photosynthetic bacterial reaction centers. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 11:57-80.
 27. Philbrick, J. B., and B. A. Zilinskas. 1988. Cloning, nucleotide sequence and mutational and lysis of the gene encoding the photosystem II manganese-stabilizing polypeptide of *Synechocystis* 6803. Mol. Gen. Genet. 212: 418-425.
 28. Romer, S., K. Humbeck, and H. Senger. 1990. Relationship between biosynthesis of carotenoids and increasing complexity of photosystem in mutant C-6D of *Scenedesmus obliquus*. Planta. 182: 216-222.
 29. Rouskowski, M., and B. A. Ziliankas. 1980. Plant Physiol. 65: 3925-3964.
 30. Rowan, K. S. 1989. Photosynthetic pigments of algae. Cambridge Univ. press. 158-160.
 31. Schwartz, M. 1966. Light induced proton gradient links electron transport and photophosphorylation. Nature. 219: 915-919.
 32. Schiller, V. H., I. Svendsen and B. Lindberg-Moller. 1989. Subunit composition of photosystem I and identification of center \times as a [4Fe-4S] iron sulfur cluster. J. Biol. 91: 468-478.
 33. Siefermann-Harms, Dorothea. 1985. Carotenoids in photosynthesis location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. Biochemica et Biophysica acta. 811: 325-355.
 34. Siefermann-Harms, Dorothea. 1987. The light harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. Physiol. Planterium. 69: 561-568.
 35. Vainstein, A., C. C. Perteson and J. P. Thornber, 1989. Light harvestig pigment proteins of photosystem I in Maize. J. Biol. Chem. 264: 4058-4063.
 36. Witt, I., H. T. Witt, S. Gerken, W. Saenger, J. P. Dekker, and M. Rogner. 1987. Crystallization of photoactive protein complex from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. FEBS Lett. 221: 260-264.