

Cycloheximide와 Chloramphenicol 이 보리 유엽의 Chlorophyll 및 CP-Complex들의 양적 변화에 미치는 영향

허인옥, 고석찬

Effects of Cycloheximide and Chloramphenicol on the Contents of Chlorophyll and CP-Complexes
in the Greening Barley Leaves

Huh In-ok, Koh Suck-chan

Summary

Dark-grown barley seedlings were exposed for 12hr to continuous light and then the first leaves were incubated with water, CaCl_2 , cycloheximide or chloramphenicol for 12hr in the dark.

The decrease in chlorophyll b was larger than that of chlorophyll a in the dark, resulting in higher chlorophyll a/b ratio than in the illuminated leaves. As the decrease of chlorophyll b was inhibited in the presence of CaCl_2 , cycloheximide or chloramphenicol, the chlorophyll a/b ratio got lower. CPI became a more prominent peak with a concomitant decrease in LHCP in the dark, but this change of CP-complexes began to disappear when the leaves were incubated with CaCl_2 , cycloheximide or chloramphenicol.

These results indicate that the changes in the chlorophyll a/b ratio and the CP-complex content of the illuminated leaves in the dark are controlled with CaCl_2 and that there is a close relationship between the protein synthesis and the contents of chlorophyll or CP-complexes.

서 론

Sodium dodecyl sulfate / polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 thylakoid로부터 chlorophyll-protein complex (CP-complex)들을 분리하기 시작한 이후 (Ogawa, T. *et al.*, 1966), CP-complex에 대한 많은 지식이 SDS-PAGE를 이용하여 얻어지고 있다. Thornber, J.

P. (1975) 등은 thylakoid로부터 chlorophyll이 결합하고 있는 3개의 band를 분리하였고, 그 중에 2개는 CP-complex들이고 나머지 하나는 free chlorophyll (FC)임을 확인하였다. 또한 이들 CP-complex들의 단백질의 생합성과 조절이 빛에 의하여 이루어진다고 보고되었는데 (Apel, K. and Kloppstech, K., 1980), 최근에 Tanaka, A. and Tsuji, H. (1982)가 오이 자엽을 이용한 실험에서 greening 초기에 불안정한 chlorophyll이 존재

하며 암처리에 의해서 chlorophyll b와 light-harvesting chlorophyll a/b-protein(LH-CP)이 감소하고 CaCl₂를 처리함으로써 이러한 현상이 회복되는 것을 관찰하였다.

따라서 본 실험은 greening 초기의 불안정한 chlorophyll과 CP-complex들의 존재 유무와 그에 미치는 CaCl₂의 효과를 확인하는 한편, 세포질 내에서의 단백질 합성 억제제인 cycloheximide와 엽록체 내에서의 단백질 합성 억제제인 chloramphenicol을 사용하여, greening 초기의 chlorophyll과 CP-complex들의 양적 변화와 단백질 합성과의 관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료: 농촌진흥청 작물시험장으로부터 분양받은 보리종자(*Hordeum vulgare* L. cv Baecdong)를 7일간 암처에서 키운 다음, 25°C에서 750ft·c로 12시간 동안 greening 시킨 후 제 1엽을 12시간 동안 CaCl₂, cycloheximide 또는 chloramphenicol 등과 함께 암처리하여 실험재료로 사용하였다.

Chlorophyll의 측정: Ogawa, T. and Sibata, K. (1965)의 방법에 따라 666nm에서 absorbance를 측정한 후 chlorophyll 함량을 산출하였다.

CP-complex들의 분리 및 전기영동실험:

Lee, C.B. et al (1983)의 방법으로 CP-complex들을 분리하고, Laemmli, U.K. (1970) 방법을 변형한 SDS-PAGE를 실시하였다 (Lee, C.B. et al, 1983).

Chlorophyll 분포의 산출: 675nm와 650nm에서의 densitometer tracing을 절단한

전체 무게와 두파장에서의 동일 band의 평균 무게를 측정하여 상대적인 chlorophyll 분포를 산출하였다 (Aro, E-M. 1982).

결과 및 고찰

CaCl₂의 영향: 암처리를 하였을 경우에는 암

Table 1. Chlorophyll content and chlorophyll a/b ratio before or after dark incubation of the illuminated barley leaves

Treatment	Chl a	Chl b	Total Chl	Chl a/b
	μg/g fresh weight			
CL	156.6	64.7	221.3	2.4
CLD	136.4	48.4	184.8	2.8
CLD +30mM CaCl ₂	131.4	59.6	191.0	2.2
CLD +50mM CaCl ₂	130.1	65.4	195.5	2.0
CLD +75mM CaCl ₂	110.4	54.8	165.2	2.0

Seven-day-old etiolated barley seedlings were exposed for 12hr to continuous light (CL). Subsequently, the first leaves were excised and then incubated for 12hr with water (CLD) or CaCl₂.

처리 직전에 비하여 chlorophyll a가 조금 감소한 반면 chlorophyll b가 크게 감소하는데, chlorophyll a의 감소는 CaCl₂ 처리에 의하여 억제되지 않았고 chlorophyll b와 total chlorophyll의 감소는 억제되어 암처리에 의한 chlorophyll a/b 비율의 증가가 CaCl₂에 의하여 감소하는 것을 보여주고 있다 (Table 1). CP-complex들의 변화는 암처리를 하였을 경우 LHCP의 흡수 peak가 낮아지고 CPI (P700-chlorophyll a protein)의 흡수 peak가 높아지며 CaCl₂를 처리함으로써 CPI의 증

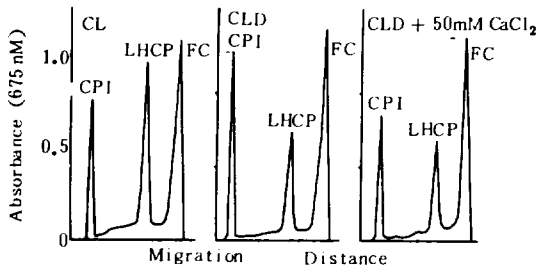


Fig 1. Densitometer tracing(675nm) of CP-complexes isolated by SDS-PAGE. Samples were treated as in Table 1.

Table 2. Relative distribution of chlorophyll among CP-complexes by SDS-PAGE

Treatment	Distribution of Chl, %			LHCP/ CP I
	CP I	LHCP	FC	
CL	10.8	38.5	50.7	3.6
CLD	19.8	27.5	52.7	1.4
CLD +30mM CaCl ₂	16.4	32.4	51.2	2.0
CLD +50mM CaCl ₂	16.3	31.7	52.0	1.9
CLD +75mM CaCl ₂	17.6	29.5	53.0	1.7

Samples were treated as in Table 1.

가가 억제되고 있다(Fig 1). 이들 각 CP-complex에 분포하는 chlorophyll 량(Table 2)은 암처리를 함으로서 LHCP에서는 감소하고 CPI에서는 급격히 증가하여 Fig 1 과 일치되는 결과이며, CaCl₂를 처리 함으로서 CPI에서 서서히 감소하고 LHCP에서는 증가하며 LHCP/CPI 비율은 암처리시의 감소가 CaCl₂에 의하여 회복되고 있다.

이와 같은 현상은 암처리시에는 새로운 chlorophyll의 합성은 일어나지 않은 채, chlorophyll a보다 chlorophyll b가 급격하게 감소 함으로서 chlorophyll a/b 비율이 증가했음

을 알 수 있는데 (Lee, C.B. *et al*, 1983), continuous light 하에서는 chlorophyll a에서 부터 chlorophyll b가 합성되나 intermittent light 나 암처리 하에서는 이러한 현상이 일어나지 않는다는 Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. *et al* (1982)의 보고와 일치하는 결과이며, CaCl₂를 처리 함으로서 암처리시에도 chlorophyll a에서부터 chlorophyll b가 합성되어 chlorophyll a/b비율이 감소하는 것으로 보인다(Tanaka, A. and Tsuji, H., 1982).

또한 암처리시에 CPI의 증가는 암처리에서 새로운 chlorophyll의 합성은 일어나지 않은 채 CPI의 chlorophyll은 다른 protein에 결합되었던 chlorophyll이 전이되었음을 암시하고 있으며, LHCP의 감소가 일어나는 것으로 보아 LHCP-apoprotein 으로부터 떨어져나온 chlorophyll a가 CPI-apoprotein에 binding되며 (Lee, C.B. *et al*, 1983 ; Tanaka, A. and Tsuji, H., 1982), CaCl₂ 처리시에도 Table 2에서 FC이 거의 일정하다는 사실에서 CPI과 LHCP 사이에는 밀접한 상호관계가 있음을 알 수 있는데, Tanaka, A. and Tsuji, H. (1982)는 intermittent light를 조사하는 실험에서 CPI에 binding되어 있는 chlorophyll a가 LHCP에 binding할 가능성을 배제할 수 없다고 보고한바에 따르면 CaCl₂는 이미 존재하는 LHCP-apoprotein에 binding할 chlorophyll b를 유도하든지 또는 chlorophyll b와 LHCP-apoprotein을 유도하는 기능을 갖고 있다고 추측할 수 있다.

Cycloheximide와 chloramphenicol의 영향 :

Cycloheximide 나 chloramphenicol에 의하여, 암처리에 의한 chlorophyll a의 감소를 억제할 수 없고 chlorophyll b는 암처리에 의한 감소가 완전히 억제되어 chlorophyll a/b

Table 3. Chlorophyll content and chlorophyll a/b ratio before or after dark incubation of the illuminated barley leaves

Treatment	Chl a	Chl b	Total Chl	Chl a/b
	μg / g fresh weight			
CL	119.9	53.8	173.7	2.2
CLD	112.1	37.0	149.1	3.0
CLD + 10μg/ml Cycloheximide	107.5	51.2	158.7	2.1
CLD + 100μg/ml Chloramphenicol	103.7	46.8	150.5	2.2

Seven-day-old etiolated barley seedlings were exposed for 12hr to continuous light (CL). Subsequently, the first leaves were excised and then incubated for 12hr with water (CLD), cycloheximide or chloramphenicol.

Table 4. Relative distribution of chlorophyll among CP-complexes by SDS-PAGE

Treatment	Distribution of Chl, %			LHCP/CP I
	CP I	LHCP	FC	
CL	10.9	33.6	55.5	3.1
CLD	17.2	30.2	52.6	1.8
CLD + 10μg/ml Cycloheximide	14.9	36.5	48.6	2.4
CLD + 100μg/ml Chloramphenicol	12.8	38.7	48.5	3.0

Samples were treated as in Table 3.

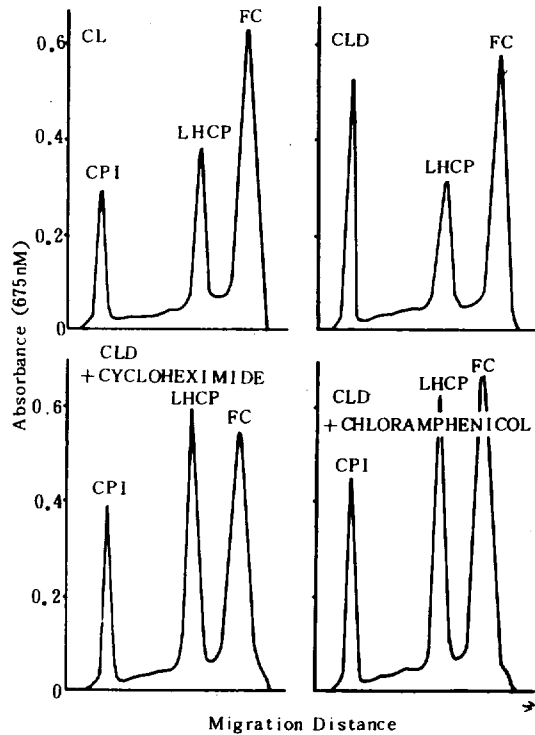


Fig 2. Densitometer tracing (675nm) of CP-complexes isolated by SDS-PAGE. Samples were treated as in Table 3.

비율이 암처리 직전과 같아지며 total chlorophyll의 감소는 chlorophyll a의 감소량과 거의 같은 것을 보여 주고 있다 (Table 3). 또한 암처리에 cycloheximide나 chloramphenicol을 처리함으로써 암처리에 의한 CPI의 흡수 peak가 높아지는 것이 억제되고 LHCP의 흡수 peak는 높아지고 있다 (Fig 2). 각 CP-complex에 분포하는 chlorophyll 함량은 cycloheximide나 chloramphenicol에 의하여 LHCP나 CPI에서 증가하는 반면 FC이 감소하는 현상을 보이고 있다 (Table 4).

Cycloheximide나 chloramphenicol에 의한 chlorophyll 함량 감소의 억제 는 보리잎의 절편을 암처리할 때 chloramphenicol을 처리

함으로서 노화를 확연히 억제할 수 있고 cycloheximide를 처리한 옥수수 잎의 절편을 암처리했을 때 total chlorophyll과 protein의 감소가 크게 억제된다는 Sabater, B. and Rodriguez, M.T. (1978), Pjon, C-J. (1981), Yu, S.M. and Kao, C.H. (1981)와 Cuello, J. and Sabater, B. (1982) 등의 보고와 일치하는 결과로, 세포질과 엽록체내에서 chlorophyll 또는 그와 관계있는 단백질의 분해와 관계있는 단백질의 합성을 억제한 결과라고 추측하여 볼 수 있고, chlorophyll a의 감소가 억제되지 않음은 좀더 깊은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 또한 Machold, O. and Aurich, O. (1972)와 Ellis, R.J. (1975) 등의 *Vicia faba*의 CPI-apoprotein이 엽록체에서 만들어지고 LHCP-apoprotein이 세포질에서 만들어지며, *Pisum sativum*은 CPI-apoprotein이 세포질과 엽록체에서 만들어지고 LHCP는 세포질에서 만들어진다는 보고에서 cycloheximide나 chloramphenicol을 처리했을 경우에 LHCP peak의 감소가 억제되는 현상은 새로운 LHCP-apoprotein의 합성에 의해서라기 보다는 LHCP-apoprotein의 분해에 관여하는 단백질 합성이 억제되는 결과로 볼 수 있으나, Table 4에서 보는 바와 같이 FC이 감소하는 것으로 보아 FC이 CPI 또는 LHCP-apoprotein과의 결합에 의한 결과라고 추측할 수 있다. 그러나 생체내에서

의 chlorophyll의 존재는 protein과 complex를 이루고 있는 상태로만 존재한다는 Markwell, J.P. et al (1979)의 보고에 따르면 좀 더 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

보리 유엽을 greening시킨 후 암처리를 행함으로써 chlorophyll 함량, CP-complex, 그리고 각 complex에 분포하는 chlorophyll 등의 양적 변화와 이에 미치는 CaCl_2 , cycloheximide 및 chloramphenicol의 영향을 조사하였다.

암처리에 의하여 chlorophyll a보다 chlorophyll b가 크게 감소하여 chlorophyll a/b 비율이 높아지고, LHCP의 흡수 peak는 낮아지고 CPI은 높아져서 LHCP/CPI비율이 감소하였다. 그러나 CaCl_2 , cycloheximide 및 chloramphenicol들에 의하여 chlorophyll b의 감소가 억제되어 chlorophyll a/b 비율이 낮아지고 LHCP/CPI 비율이 증가하였다. 이러한 사실에서 chlorophyll a와 chlorophyll b, 그리고 CPI과 LHCP사이에는 밀접한 상호관계가 있고, 이들 세가지 chemical들에 의하여 암처리시의 양적변화를 조절할 수 있으며 단백질 합성과도 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

参 考 文 献

- Apel, K., K. Kloppstech. 1980. The effect of light on the biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Planta* 150:426-430.
- Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., A. Gastorinis. 1980. Specificity of the chlorophyll-to-protein binding in the chlorophyll-protein complexes of the thylakoid. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:326-335.
- Aro, E.-M. 1982. A comparison of the chlorophyll-protein composition and chloroplast ultrastructure in two bryophytes and two higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 108:97-105.
- Cuello, J., B. Sabater. 1982. Control of some enzymes of nitrogen metabolism during senescence of detached barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant & Cell Physiol.* 23:561-565.
- Ellis, R.J. 1975. Inhibition of chloroplast protein synthesis by lincomycin and 2-(4-methyl-2, 6-dinitroanilino)-N-methylpropionamide. *Phytochemistry* 14:89-93.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.
- Lee, C.B., Y.N. Hong, Y.M. Kwon. 1983. Formation of chlorophyll-protein complexes in greening rape cotyledons. *Korean J. Bot.* 26:91-99.
- Machold, O., O. Aurich. 1972. Sites of synthesis of chloroplast lamellar proteins in *Vicia faba*. *Biochim. Biophys. Acta* 281:103-112.
- Markwell, J.P., J.P. Thornber, R.T. Boggs. 1979. Higher plant chloroplast: Evidence that all chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 76:1233-1235.
- Ogawa, T., F. Obata, K. Shibata. 1966. Two pigment proteins in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 112:223-234.
- _____, K. Shibata. 1965. A sensitive method for determining chlorophyll b in plant extracts. *Photochem. Photobiol.* 4:193-200.
- Pjon, C.-J. 1981. Effects of cycloheximide and light on leaf senescence in maize and hydrangea. *Plant & Cell Physiol.* 22:847-854.
- Sabater, B., M.T. Rodriguez. 1978. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. *Physiol. Plant.* 43:274-276.
- Tanaka, A., H. Tsuji. 1982. Calcium-induced formation of chlorophyll b and light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in cucumber cotyledons in the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 680:265-270.
- Thornber, J.P. 1975. Chlorophyll-proteins: Light harvesting and reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 26:127-158.
- Yu, S.M., C.H. Kao. 1981. Retardation of leaf senescence by inhibitors of RNA and protein synthesis. *Physiol. Plant.* 52:207-210.