

C-4 식물 엽록체내 격자결정구조 형성에 관한 HVEM 연구 Formation of Chloroplast Crystalline Structures in C-4 Plants Using HVEM

김인선

계명대학교 자연과학대학 생물학과

1. 서론

식물은 광합성 양식에 따라 생리·생화학적 또는 구조적으로 매우 다른 C-3, C-4, CAM 식물로 대별되는데, 이들의 잎은 구조와 기능의 분화가 환경조건에 잘 적응되어 합리적인 특성을 보여주며 광합성을 수행한다. C-4 식물은 광합성의 초기산물로 말산(malic acid)과 같은 C-4 화합물을 형성하는 특유한 유기산 대사를 수행한다. C-4 식물의 광합성조직은 Kranz 구조를 이루며 유관속초세포와 인접한 엽육세포로 분화되어 있다. 이 두 세포 유형에 관한 연구는 고등식물의 구조와 기능간의 밀접한 관계를 밝히는데 매우 중요한 정보를 제공하고 있다. C-4식물에서는 C-4 광합성의 제 1회로가 엽육세포(mesophyll cell)에서, 제 2회로는 유관속초세포(bundle sheath cell)에서 이루어진다.

엽록체(chloroplast)는 이와 같이 광합성에서의 역할뿐만 아니라 세포 내에서 여러 가지 대사과정을 동시에 수행하는 기능적으로 복잡한 세포내 소기관이다. 또한 엽록체는 매우 역동적이어서 분열하고 분화발달하여 특수한 신진대사와 구조를 갖는 여러 유형의 형태로 변화가 가능하다. 광합성 엽육조직의 엽록체는 전색소체(proplastids)로부터 발달하는데, 전색소체는 미분화된 조직의 세포 내에서 형성되는 색소체 전구체(precursor)라 할 수 있다. 전색소체는 흔히 전판상체(prolamellar body)라고 하는 격자상의 판상체계(lamellar system)를 구조적 marker 로 형성한다. 이들은 빛을 받으면 곧 엽록체로 전환되어 명반응이 일어나는 틸라코이드(thylakoids)와 그라나(grana)의 판상 내막 구조로 발달한다. 내막으로 둘러싸인 엽록체내 액체성 구획은 기질(stroma)로서 DNA, 리보솜 및 각종 효소가 포함되어 있으며, 광합성의 암반응인 캘빈회로가 일어나는 중심부이다. 이들 격자결정구조는 단백질성 전구물질로 된 구조로서 일부 식물이 제한된 조건에 적응하여 CAM 식물에서는 광합성을 수행할 때 필요한 효소를 저장하여 공급해주는 부위라 추정되고, 일부 C-4 식물에서는 수분 조건 등에 따른 적응현상으로 생장 단계에 따라 엽록체 분화를 보이는 등 세포수준에서 격자결정구조 형성과 같은 미세구조적 분화를 유도시킬 수 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 세포 유형에 따라 상이하게 발달하는 C-4 식물 *Salsola komarovii* 엽록체내 격자결정구조의 형성 과정 및 그 구

성요소들의 특성을 연구하여 이들의 기능적, 구조적 특성을 규명하고자 하였다.

2. 실험 방법

본 연구에서는 *Salsola* 미분화 및 성숙 발달한 엽육조직을 chemical fixation과 high pressure freezing (HPF) 등의 급속동결기법을 이용 고정된 후, 초박절편(60-90 nm)과 후박절편(0.25-0.5 μm)으로 제작하여 특수염색하였고, 1-2회 carbon coating 하여 TEM 및 HVEM으로 연속절편(serial section)에 의한 2-D 영상과 tilting image 결과를 수집하였다. 수집된 이들 초미세 구조들에 대하여 diffraction pattern을 실시하고, 디지털화한 image의 3차원 영상 재구현에 필수적인 IMOD 프로그램 적용하였다. Tilting 및 tomography 기법을 이용한 image processing 처리과정을 거쳐 HVEM 전자현미경으로부터 얻어진 data에서 초미세 세포영상의 구조 정보를 추출하여 세포수준에서의 3-D image를 재구축하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

Salsola 엽육의 여러 성장 단계의 잎을 이차적으로 연구한 결과 모든 단계의 엽육세포 엽록체에는 격자결정구조가 형성되었으며, 격자결정구조의 크기는 분화 초기의 엽육조직이나 성숙 발달한 엽육조직이나 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다. 격자결정구조를 구성하는 초미세구조들이 section angle에 따라 또는 HVEM 상에서 일정한 각도로 tilting 함에 따라 상이한 구조들 pattern을 보여 이들에 대한 tilting($\pm 2^\circ$, $\pm 5^\circ$, $\pm 6^\circ$)을 실시하여 동일 격자결정구조 내에서의 격자구조(crystalline lattice)와 평행구조(paralleled arrangement)를 확인하였다(Fig. 1). 이들 격자결정구조 내에는 약 10.2 nm의 간격으로 격자구조를 형성하거나 평행으로 배열된 60-90개 정도의 막성계 요소들(membrane elements)이 규칙적으로 배열하며 격자결정구조 형성에 관여하는 것으로 나타났다. 약 2° 간격으로 $\pm 60^\circ$ 까지 tilting 시킨 엽록체 연구로부터 이들 격자결정구조를 구성하는 요소들이 기질에서 격자결정구조를 직접 접하는 틸라코이드 막으로부터 기원하는 것으로 나타났다. 이들 격자결정구조는 어떠한 일정한 구조의 막으로 둘러싸이지는 않으나 틸라코이드 막들은 격자결정구조의 여러 측면에서 격자결정구조를 접하여 그 형성에 관여하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2).

연속절편 연구 및 3-D 입체구조 재구현 분석에 의하면 하나 이상 분리되어 형성된 것처럼 관찰되던 격자결정구조들은 융합하여 하나의 격자결정구조를 이루기도 하였다. 이들 또한 일정한 형태를 이루지 않는 무정형(amorphous)의 구조를 이루고, 세포내 격자결정구조는 거의 대부분 녹말입자와 연계되어 발달하는 양상이었다. 향후에는 격자결정구조를 구성하는 요소들의 틸라코이드 막성계로부터의 발달을 추적, 그 기원을 정확히 밝히는 실험을 수행할 계획이다.

4. References

- Boekema EJ, van Breeman JFL, van Roon H, Dekker JP (2000) Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *J Mol Biol* 301: 1123-1133.
- Nield J, Orlova EV, Morris EP, Gowen B, van Heel M, Barber J (2000) 3D map of the photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nature Struct Biol* 7: 44-47.
- Otegui MS, Staehelin LA (2004) 3D tomographic analysis of post-meiotic cytokinesis during pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 501-515.
- Perktold A, Zellnig G, Guttenberg H, Gailhofer M (1998) 3D reconstruction of chloroplasts and their ultrastructure using ultra-thin-serial-sections. *Phyton* 38: 159-165.
- Scheres B (2001) Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol* 125: 112-114.
- Segui-Shimarro JM, Austin JR, White EA, Staehelin LA (2004) Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell* 16: 836-856.

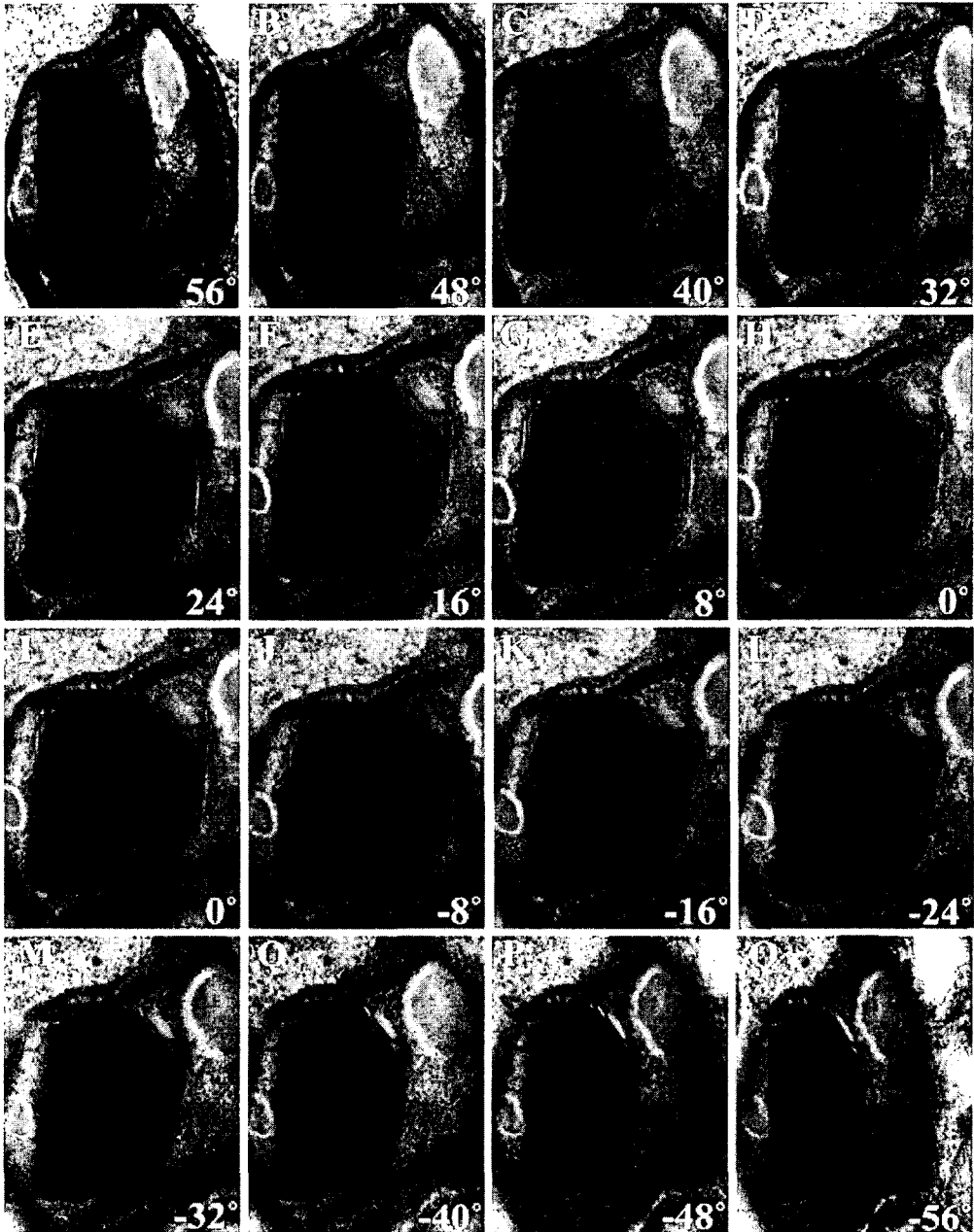


Fig. 1. 8° 간격의 이미지를 ± 56°까지 얻어 격자결정구조와 인접하고 있는 녹말입자 및 틸라코이드막의 공간적인 연계성을 추적하여 이들 초미세구조 간의 3차원적 입체 분포를 더욱 확실히 알 수 있다.

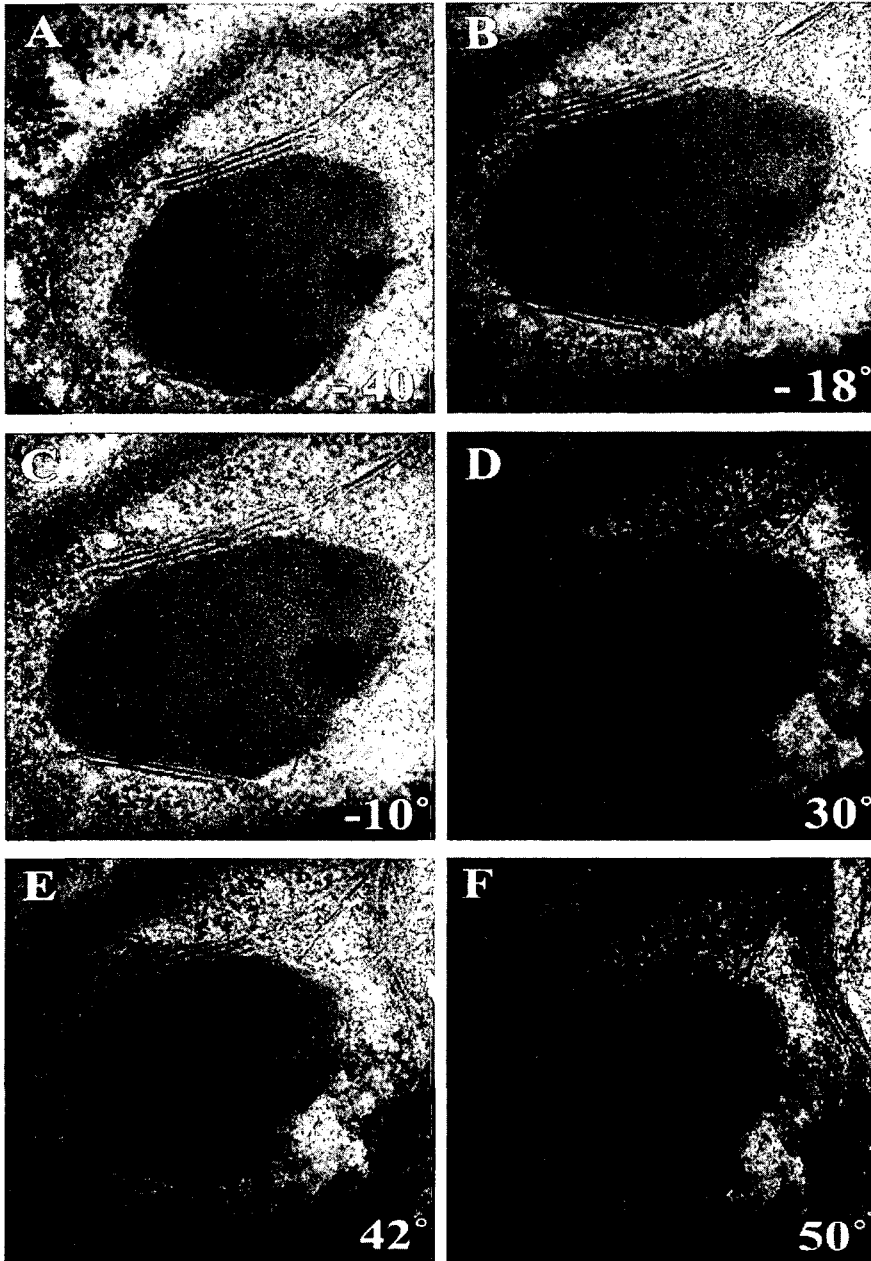


Fig. 2. Tilting에 따른 결정구성요소와 틸라코이드 막성계와의 공간적 연관 관계를 나타내는 HVEM 사진들.