

## 發芽過程에 따른 大豆蛋白顆粒의 變化에 關하여

廉榮重 · 朴敏哲 · 權寧命

(서울大學校 自然科學大學 植物學科)

### Changes of Protein Bodies in the Soybean Cotyledons during Early Germination

Youn, Young Choong, Min Chul Park, and Young Myung Kwon

(Department of Botany, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

Ultrastructural changes of the protein bodies in *Glycine max* during early germination were studied. There were no major morphological changes in protein bodies within 3 days after the imbibition, but from the 4th day the expanse of protein bodies could be observed. In subsequent stages, the aggregation of protein bodies coalesced into a large mass and then less electron-dense material in the central part of the cell. At last it became highly vacuolated.

豆科植物의 種子에서 貯藏蛋白質은 單層의 膜으로 싸인 蛋白顆粒(protein body)의 形態로 存在한다. 種子內의 蛋白顆粒은 Hartig(1855)에 의하여 처음으로 觀察되었으며 그후 電子顯微鏡 觀察技術의 發達로 詳細한 研究가 進行되었다. 一般的으로 蛋白顆粒은 ficin 酸 및 Mg, K 등의 金屬鹽을 含有하는 globoid를 갖는 것(Lui, 1967), 結晶狀의 貯藏蛋白質 즉 crystalloid를 含有한 것, 그리고 以上の 兩者를 모두 含有한 것(Tully, 1976) 및 전혀 subunit를 含有하지 않는 것들의 別가지 형태로 區分되며(Rost, 1972; 深澤, 1976; Ashton, 1976) 그 크기는 種에 따라 차이가 있으나 대개 0.1 $\mu$ m에서 22 $\mu$ m 정도이다. 發芽過程에 있어서 蛋白顆粒은 加水分解되면서 細胞中央部에 液胞를 形成하게 되는데(Guillermond, 1908), 이러한 過程은 두가지로 說明할 수 있다. 첫째 中心部에서 加水分解가 일어나 內腔을 만들거나, 또는 周邊部 즉 膜部位에서 分解가 일어나 만드는 것이다. 그런데 前者는 蛋白顆粒 內部에 存在하는 蛋白質 分解酵素에 依하는 것으로 생각할 수 있고, 後者는 酵素가 膜部位에 存在하거나 혹은 蛋白顆粒 外部로부터 投入되는 것으로 看做할 수 있다. 한편 植物에 따라서는 蛋白顆粒의 內部가 먼저 완전히 加水分解되어 液胞가 形成된 다음 融合이 일어나는 경

우도 있으나(Horner, 1965; Rost, 1972), 대개는 蛋白顆粒이 部分的으로 分解되어 融合하면서 細胞中央部에 커다란 덩어리를 形成한다(Ashton, 1976). 大豆의 경우 發芽가 進行됨에 따라 蛋白顆粒이 점점 더 粒狀으로 되면서 膜이 없어지고 때로는 細胞中央에 불규칙한 덩어리를 形成하며(Tombs, 1967) 결국에는 液胞로 된다고 記述하고 있을 뿐이다(Treffry et al., 1967).

蛋白顆粒의 加水分解와 融合에 關여하는 酵素學的인 研究는 보리(Ory et al., 1969), 완두(Yomo et al., 1973), 옥수수(Harvey et al., 1974), 팥(Chrispeels et al., 1975) 등에서 研究가 있었으며, 또한 蛋白顆粒의 分離와 造成에 關한 試圖가 여러 사람에게 依하여 進行되었다(Wolf, 1971; Hill, 1974; Thanh, 1975; 李, 1977).

이러한 研究中에는 蛋白顆粒內에 存在하는 蛋白質 加水分解酵素만으로는 autolysis를 일으킬 수 없다는 結果가 있는 반면(Chrispeels et al., 1975), 수수에서 分離한 蛋白顆粒은 培養 할 때 충분한 autolysis가 일어났다는 報告가 있다(Adams, 1975).

따라서 本實驗에서는 Tombs(1967)와 Treffry(1967) 등이 試圖하였던 大豆의 發芽過程에 따라 進行되는 蛋白顆粒의 形態의인 變化를 보다 詳細히 觀察함으로써

貯藏蛋白質의 分解가 始作되는 部位와 時期를 確認하고자 하였다.

實驗에 使用한 種子是 育우 3호 大豆(*Glycine max*; 1975年 收穫: 農村振興廳 作物試驗場)로서 0.1% HgCl<sub>2</sub> 로 10分間 滅菌한 후 젖은 여과지가 깔린 petri dish 에 넣어 暗所 25°C에서 發芽시켰다.

種子에 吸水시키기 始作한 후 3時間, 그리고 1, 2, 3, 4, 5, 및 8日된 것의 子葉을 취하여 中央部位를 1mm<sup>3</sup> 크기로 잘라내어 1% osmium tetroxide로 4°C에서 3時間 固定시켜 脫水한 後(Hayat, 1972), Epon 812에 包埋한 다음 ultramicrotome (LKB Ultratome III 8301A)으로 500Å의 薄片을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 染色한 後, JEOL, JEM T-7, 電子顯微鏡으로 60KV에서 觀察하였다.

各 試料의 觀察結果를 보면, 大豆子葉內의 蛋白顆粒은 subunit를 갖고 있지 않았으며, 크기는 1~15μm 로 多樣하였고 單層의 膜으로 싸인 球型이었으며 均一한 電子密度의 基質을 갖고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6). 이러한 蛋白顆粒은 發芽가 進行되면서 3日까지는 大部分의 細胞에서 큰 變化가 觀察되지 않았으나(Fig. 1), 4日째부터는 引接한 蛋白顆粒들이 서로 密着되는 것을 볼 수 있었으며 接觸部位가 electron transparent해지면서(Fig. 2, 3) 점차 融合이 일어나는 것을 알 수 있었는데 이것은 發芽始作後 4日 정도부터 蛋白質 加水分解酵素의 活性이 있게 되는 것을 뜻하는 것이며 育우수(Harvey *et al.*, 1974)나 팔(Yomo *et al.*, 1973)에서 3, 4日 後에 酵素活性이 있게 된다는 結果와 一致한다고 보겠다. 發芽後 5日째에는 大部分의 蛋白顆粒이 서로 融合하면서 消滅된 膜物質의 痕跡이 남아 있음을 볼 수 있었고(Fig. 4, 5와 表 부위) 漸次 커다란 덩어리로 뭉치는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 8日 되었을 때에는 融合된 蛋白顆粒의 電子密度가 急激히 變하기 始作하였고(Fig. 7) 周邊의 膜構造는 더욱 明確해지면서 液胞로 되는 것을 觀察할 수 있었다(Fig. 8).

이러한 發芽過程에 따른 大豆蛋白顆粒의 變化時 顆粒間의 密着이 먼저 일어나는지 部分分解가 먼저 일어나는지 本 觀察로는 밝힐 수 없었지만 顆粒이 部分的으로 分解되면서 이웃한 蛋白顆粒들 사이에 融合이 일어나 한 덩어리가 된 다음 細胞中央의 液胞로 되는 一般的인 蛋白顆粒의 變化類型을 거쳤다고 생각된다(Ashton, 1976). 이것은 各各의 蛋白顆粒의 貯藏蛋白質이 完全히 分解되는 類型(Horner, 1965; Rost, 1972)과는 相異하다. 또 蛋白顆粒의 膜部位에서 變化가 일어나(Fig. 2) 膜의 모양이 一定하지 않게 되어(Fig. 3, 4, 5,

6) 蛋白顆粒이 崩壞되는 形像으로 이루어 볼 때 蛋白質 分解酵素의 적어도 일부는 蛋白顆粒의 膜에 存在한 것이며, 電子密度의 底下가 均一하게 일어나는 것을 보아 顆粒內에도 酵素分布가 均一한게 아닌가 생각된다. 그렇지만 融合過程에서 顆粒들의 膜의 形態가 극히 無秩序한 狀態를 보이는 것으로 보아(Fig. 3~5) 蛋白顆粒 이외의 細胞內溶物이 融合過程에서 顆粒內로 投入될 가능성은 排除할 수 없을 것 같다. 그러나 蛋白顆粒들 사이에 어떻게 融合이 일어나고, 또 膜이 어떻게 消滅되면서 하나로 뭉쳐지는 가에 對하여는 앞으로 많은 研究가 이루어져야 한다고 思考된다.

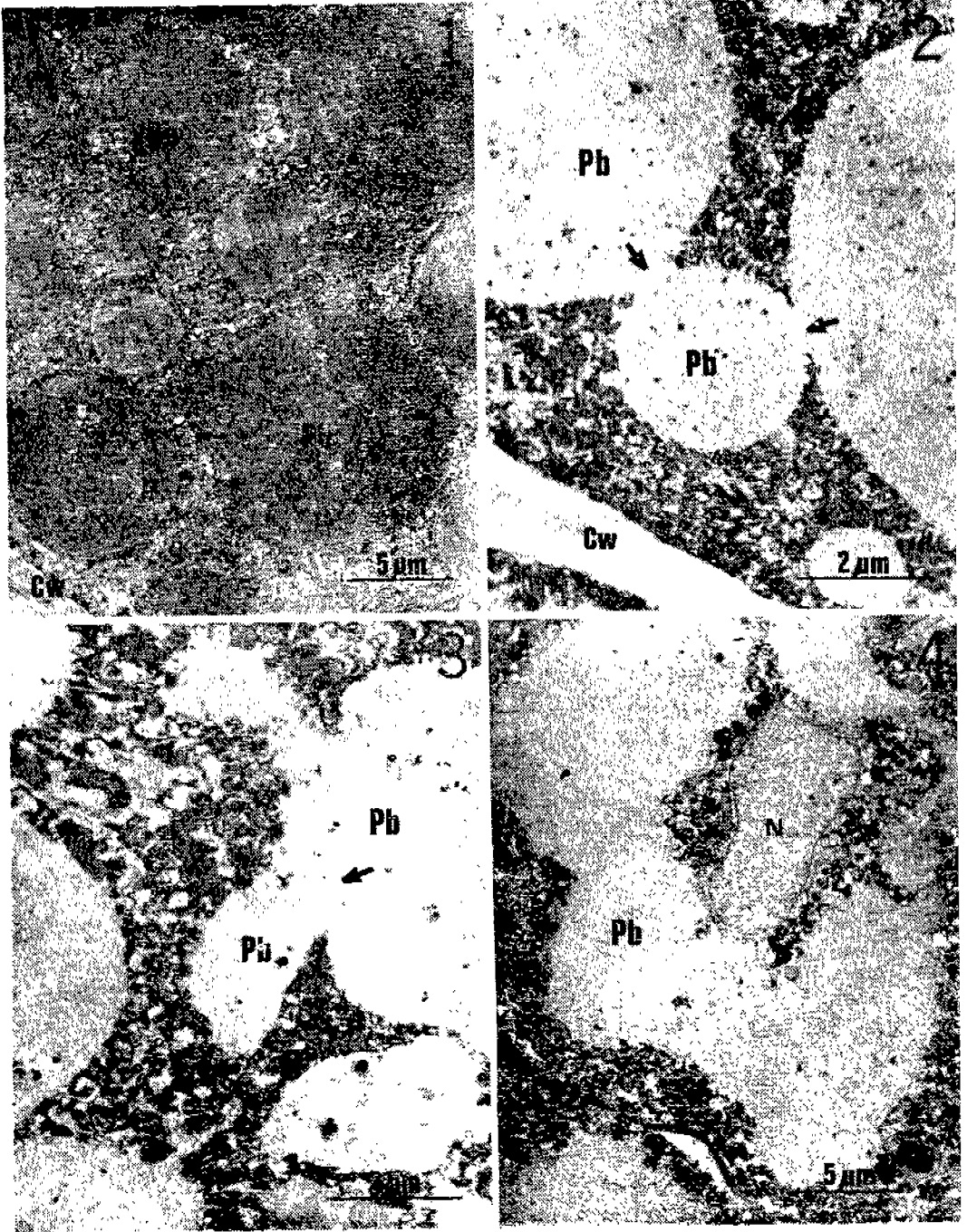
한편 大豆에서 分離된 蛋白顆粒을 培養할 때 24時間 以內에 顆粒으로부터 많은 量의 유리아미노산이나 peptide가 生成되는 것(Youm, 1977)으로 보아 酵素가 顆粒內에 있으며 顆粒內酵素만으로 충분히 加水分解된다는 것을 알 수 있어 in vivo의 觀察結果(Fig. 2~8)와 一致한다고 보겠다. 그리고 이 結果는 수수(Adams, 1956)에서 分離한 蛋白顆粒에서의 樣狀과 一致했다.

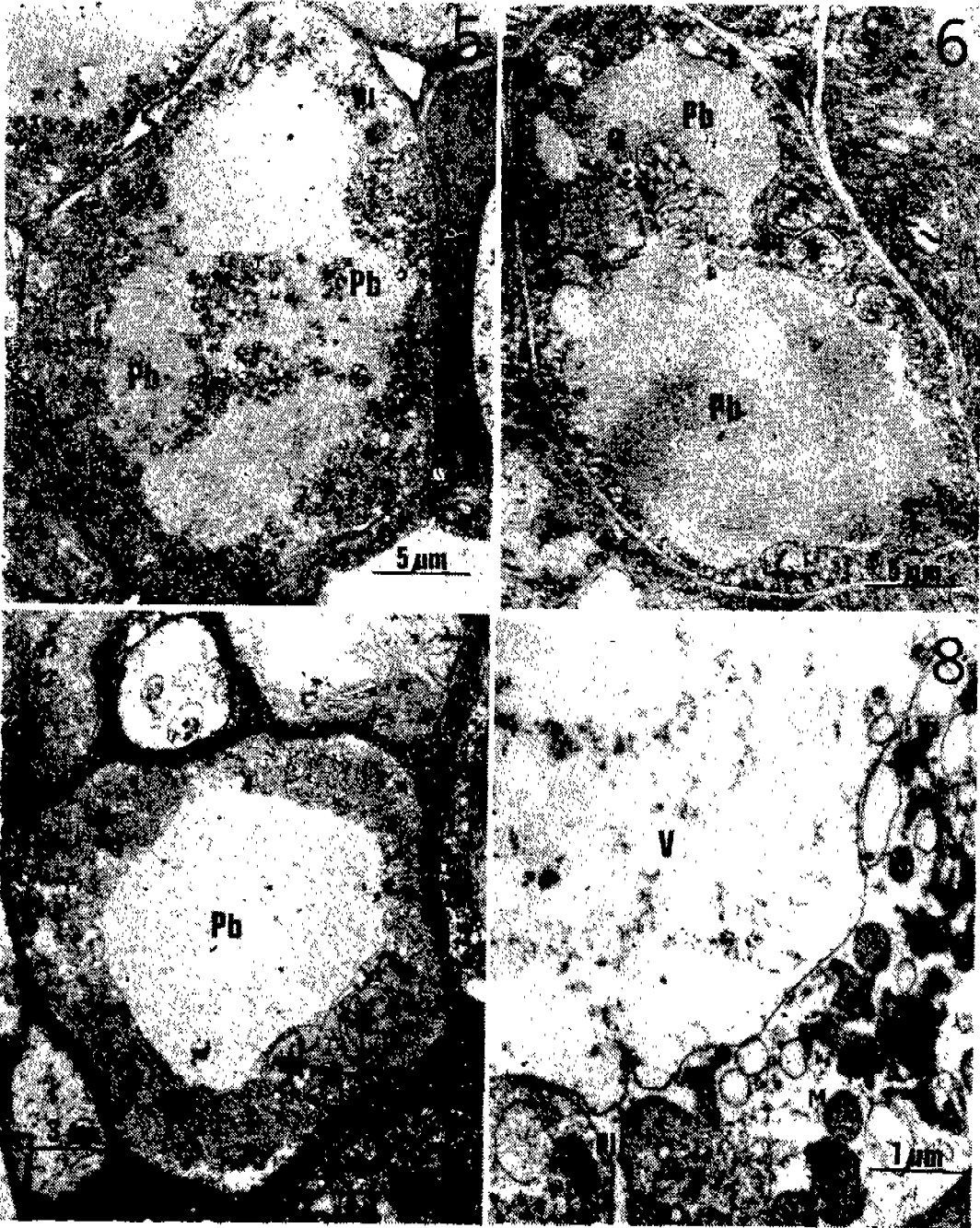
그런데 in vivo에서 顆粒의 變化가 3日 지난 後에야 있게 되고 in vitro에서는 24時間內에 生化學的 變化가 일어나는 것은 in vivo에서는 細胞內에 抑制物質이 있거나 또는 어떤 調節機構가 있어서 酵素活性을 調節하기 때문일 것이다.

以上的 結果로 大豆의 蛋白顆粒은 發芽時 서로 融合되어 일단 中央部에 한 덩어리로 뭉쳐진 後에야 活潑한 蛋白質分解가 일어나 液胞로 된다고 結論지을 수 있다.

## 參 考 文 獻

- Adams, C.A. and L. Novellie. 1975. Acid hydrolases and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seed of *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench. *Plant Physiol.* 55: 7-11.
- Ashton, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 95-117.
- Chrispeels, M.J. and D. Boulter. 1975. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans. Role of endopeptidase. *Plant Physiol.* 55: 1031-1037.
- 深澤親房. 1976. 植物プロテインボディの調製法. 植物酵素蛋白質研究法 別冊蛋白質核酸酵素. pp. 134-145.
- Guillermond, A. 1903. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 10: 141-226. (Cited from: Ashton, F.M. 1976. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 95-117)
- Harris, N. and M.J. Chrispeels. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein autolysis in cotyledons of germinating mung beans. *Plant Physiol.* 56: 292-299.





- Harvey, B.M.R. and A. Oaks. 1974. Characteristics of an acid protease from maize endosperm. *Plant Physiol.* 53: 449—452.
- . 1944. The hydrolysis of endosperm protein in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 53: 453—457.
- Hartig, T. 1855. *Botan. Zeit.* 13: 881 (Cited from: 深澤親房. 1976. 植物酵素・蛋白質研究法 別冊蛋白質核酸酵素 pp.134—145)
- Hayat, M.A. 1972. Basic electron microscopy techniques. Van Nostrand Reinhold Co.
- Hill, J.E. and R.W. Beidenbach. 1974. Proteins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of the components. *Plant Physiol.* 53: 742—746.
- Horner, H.T. Jr. and H.J. Arnott. 1965. A histochemical and ultrastructural study of yucca seed proteins. *Amer. J. Bot.* 52: 1027—1038.
- Lee, J.S. 1977. Studies on the biochemical features of soybean seed for higher protein variety. *J. Korean Soc. Crop Sci.* 22: 1—32.
- Lui, N.S.T. and A.M. Altschul. 1967. Isolation of globoids from cotton seed aleurone grain. *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 678—684.
- Ory, R.L. and K.W. Henningsen. 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. *Plant Physiol.* 44: 1488—1498.
- Rost, T. L. 1972. The ultrastructure and physiology of protein bodies and lipids from hydrated dormant and nondormant embryos of *Setaria italensis* (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 59: 607—616.
- Thanh, V. H., O. Kazuyoshi, and K. Shibaski. 1975. Isolation and characterization of the multiple 7s globulins of soybean proteins. *Plant Physiol.* 56: 19—22.
- Tombs, M.P. 1967. Protein bodies of the soybean. *Plant Physiol.* 42: 797—813.
- Treffry, T., S. Klein, and Mary Abrahamsen. 1967. Studies of fine structural and biochemical changes in cotyledons of germinating soybeans. *Aust. J. Biol. Sci.* 20: 859—68.
- Tully, R.E. and H. Beevers. 1976. Protein bodies of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 58: 710—716.
- Wolf, W.J. 1971. Soybean ultrastructure and its relationship to processing. In G.E. Inglett, (ed.), Symposium: Seed proteins. The AVI Publishing Co. pp.231—241.
- Yomo, H. and J.E. Varner. 1972. Control of the formation of amylase and protease in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol.* 51: 708—713.
- Yomo, H. and M.P. Taylor. 1973. Histochemical studies on protease formation in the cotyledons of germinating bean seeds. *Planta* 112: 35—43.
- Youm, Y.C. 1977. Changes of protein bodies during soybean germination. M.S. thesis. Seoul National Univ. 21pp.

(1978년 3월 3일 접수)

### Explanation of Figures

- Fig. 1. An electron micrograph of protein bodies in the soybean cotyledons observed on the 2nd day of germination. There is no change in protein bodies by the 3rd day.
- Fig. 2-3. On the 4th day, the protein bodies begin to fuse each others and electron transparent regions (indicated by the arrows) can be seen between them.
- Figs. 4-6. On the 5th day, the protein bodies with irregular shapes coalesce into a large single mass in the center of the cell.
- Fig. 7-8. On the 8th day, the coalesced protein body in the center of the cell becomes highly vacuolated.

Abbreviations used. Cw, Cell wall; M, Mitochondrion; N, Nucleus; Pb, Protein body; Pl, Plastid; V, Vacuole.