Korean J. Ginseng Sci.
Vol. 19, No. 3, 275~280(1995)

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 잎의 생장과정에 따른 엽록체 미세구조 및 틸라코이드막 단백질의 변화

안정숙 · 박 훈[1] · 김우갑
고려대학교 이과대학 생물학과, [1]한국인삼연초연구원
(1995년 8월 24일 접수)

Changes of Chloroplast Ultrastructure and Thylakoid Membrane Proteins during Growth of Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Leaf

Joung Sook Ahn, Hoon Park[1] and Woo Kap Kim
Department of Biology, Korea University, Seoul, Korea
[1]*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute*
(Received August 24, 1995)

Abstract[ ]The formation of thylakoid membrane proteins and changes in the chloroplast ultrastructure of ginseng leaf were investigated as a function of time following the leaf emergence. The leaf chloroplast obtained just after the leaf emergence showed short rod-like thylakoids which were connected and arranged in 3~4 layers along the longitudinal axis of the chloroplast. The 10 DAE (days after emergence) chloroplast started to form grana structure. The typical grana structure was observed 17 DAE, and the grana was fully developed 28 DAE. The membrane proteins obtained from just after emerging leaf were separated into many minor bands indicating no CP-complex formation yet. LHC II was detected after 10 days. CP 47 and CP 43 were detected after 17 days. After 28 days, the PS I and PS II proteins were distinctly separated into CP I, LHC II, CP 47, CP 43, CP 29, CP 27+24. Thus, the appearance of the light harvesting protein, LHC II, which was concentrated in grana stacks, was consistent in time with the formation of grana stacks 17 DAE.

Key words[]Chloroplast ultrastructure, grana, CP-complex, LHC II.

서 론

엽록체의 발달은 어린잎이 지표면으로 출엽한 후 광에 노출되는 기간에 비례하여 잎의 녹화를 수반하며 진행된다. 초기 광합성 기구의 발달을 위하여 엽록소의 존재와 grana 구조의 형성은 필수적 요인이 된다. 일단 광에 노출되면 전엽록소는 엽록소로 급속히 전환되며 prolamellar body의 구조적 재배치를 수반하여 틸라코이드 막계를 형성한다. 이러한 엽록체의 구조적 변이와 엽록소 함량의 급속한 증가는 평행하게 진행되며 이에 따라 광합성능은 증가된다.[1,2]

구조적 측면에서의 엽록체 발달 과정은 광노출 하에서 prolamellar body의 해체와 소포의 형성, 그후 틸라코이드가 신장되고 수가 증가하며 몇 개의 틸라코이드들이 중첩되며 grana를 형성하기 시작한다.[1,3,4] Lee 등[4]은 인삼 잎의 초기 엽록체 발달 과정에서 grana의 형성은 광이 조사된 시간에 의존되고 있음을 보고한바 있다. 최근의 틸라코이드막 단백질 생합성에 관한 연구들로 광합성 기구를 구성하고 있는 단백질들이 밝혀졌으며 이들은 첫째로 광계 I의 단백질들인 chlorophyll protein complex of photosystem I(CP I), light harvesting chlorophyll protein complex of photosystem I(LHC I), 둘째로 광계 II의 단백질들인 light harvesting chlorophyll protein complex of pho-

tosystem II(LHC II), CP 47, CP 43, CP 29, CP 27, CP 24, 셋째로 광계 I과 광계 II 사이에서 H_2O로부터 NADP로 전자전달계를 작동시키는 cytochrome b6/f complex, 넷째로 ATP synthetase로 구분되었다.[5,6] 특히 광계 I과 광계 II의 구성 단백질들은 광에너지를 포획해서 reaction center(P_{700}, P_{680})로 전달하는 기능을 하고 있다. 초기 광합성계에서 광계 I과 광계 II의 단백질 생합성은 잎의 생장기에 받는 광에 의하여 조절된다고 하였으며[5,7] 박 등[8]은 인삼에서의 chlorophyll protein-complex (CP-complex)의 형성이 광이 조사된 시간에 의존되고 있음을 보고한 바 있다.

광에 의하여 유도되는 초기 엽록체 발달 과정에서의 그 구조적 변화와 틸라코이드막 단백질들의 생합성은 시기적으로 상호 매우 밀접한 관련이 있다고 생각되었으나 인위적으로 광선을 조사시켜 유발된 녹화 과정에서의 보고가 있었을 뿐[4,8] 자연 상태의 잎이 성숙되는 과정에서는 연구된 바 없었다. 또한 이 과정의 연구는 초기 광합성 기구의 단계별 구성 시기를 이해하는데 중요하다고 생각되었다. 따라서 본 연구는 인삼을 대상으로 하여 구조적인 측면에서의 틸라코이드의 분화와 grana의 형성, 생리적 측면에서의 틸라코이드 막 단백질이 생합성되는 시기와 그 연관 관계를 구체적으로 밝히고자 잎이 성장하며 변화되는 엽록체 발달 과정을 출엽 직후부터 3일, 10일, 17일 그리고 28일 후로 구분하여 단계별로 추적 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

인삼연초연구원 인삼 재배포장(태양광 5%)의 3년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 잎을 1993년 4월 19일부터 출엽 후 시기별로 3일, 10일, 17일, 28일 후로 구분하여 각각 실험 재료로 사용하였다.

2. 전자 현미경적 방법

각 시기별로 채취한 인삼잎의 엽육부를 1 mm^2의 절편으로 만들어 3% glutaraldehyde 용액에서 2시간 전고정 후 1% OsO_4 수용액에서 1시간 후고정한 것을 sodium phosphate buffer(25 mM, pH 7.1)로 20분 간격으로 3회 세척하였고 에탄올-아세톤 농도 상승 순으로 탈수한 다음 Spurr 포매액에 포매하였다. 포매한 블럭을 LKB-V형 ultramicrotome으로 잘라 은색 절편을 취하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 JOEL JEM 100CX-I 투과 전자 현미경(80 kV)으로 미세구조를 관찰하였다.

3. 엽록체의 분리

엽록체의 분리는 Camm과 Green[9]의 방법에 준하여 각 시기별로 채취된 인삼잎(2 g)을 액체질소에 냉동시켜 저장한 후 각각의 인삼잎을 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $Na_4P_2O_7$, 50 mM Hepes-NaOH(pH 6.9)를 함유하는 완충액과 소량의 sea sand를 막자 사발에 넣고 마쇄한 후 8겹의 가아제로 여과한 여과액을 원심 분리하였다. 침전물은 10 mM $Na_2P_2O_7$-HCl(pH 7.4) 완충액으로 2회 세척한 후 원심 분리하였다. 뒤이어 0.3 M sucrose, 2 mM tricine(pH 7.0)의 완충액으로 세척한 후 원심 분리하였다.

4. 틸라코이드 막 단백질의 분리

Undenatured CP-complex의 분리는 Camm과 Green[10]의 방법에 준하여 수행하였다. 세척한 틸라코이드 막은 2 mM Tris-maleate(pH 8.0)로 세척 후 원심 분리하였다. 이때에 소량의 현탁액을 따내어 chlorophyll 함량을 결정하는데 사용하였고 침전물은 300 mM octylglucoside가 포함된 2 mM Tris-maleate 완충액에 처리하여(chlorophyll/octylglucoside = 1/20, w/w) 곧 40% glycerol에 2배로 희석하여 전기영동 시료로 사용하였다. 위의 실험은 전과정을 0~4℃에서 실시하였다.

5. 전기영동

틸라코이드 막 단백질을 Laemmli[11]의 방법에 따라 10% separating gel과 4% stacking gel에 loading하여 20 mA로 4℃에서 4~5시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie blue R250으로 염색 후 탈색하였다. 염색한 gel은 LKB laser densitometer로 각 band의 intensity를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 엽록체의 미세구조 변화

인삼잎이 재배포장(태양광 5%)에서 지표면으로 출엽된 후 성장되는 과정을 5단계로 구분하여 미세구조 변화를 관찰하였다. 출엽 직후의 틸라코이드는 작은

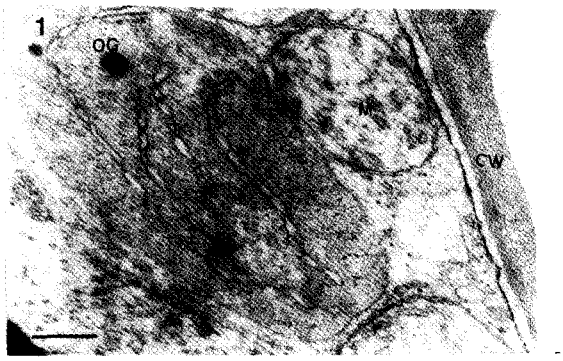

Fig. 1. Chloroplast of ginseng leaf just after emergence. Thylakoid membranes are arranged along the longitudinal axis of the chloroplast. T : thylakoid membrane, CW : cell wall, OG : osmiophilic globule, M : mitochondria. Bar = 0.5 μm.

Fig. 2. Chloroplast of ginseng leaf of 3 days after emergence. Long thylakoid membranes are formed, and the number of thylakoid membranes increases. ER : endoplasmic reticulum. Bar = 0.5 μm.

막대 모양으로 연결되어 엽록체의 장축 방향으로 3~4열 선상으로 배열하여 있었다(Fig. 1). 출엽 후 3일에는 작은 막대 모양의 틸라코이드는 신장되어 1개의 선상으로 되었고 틸라코이드의 수는 증가하여 한개의 엽록체 안에 8~10열 배열하였으며 극히 일부분에 3~5막이 중첩되어 초기 상태의 grana를 형성하기 시작하였다(Fig. 2). 출엽 후 10일에는 틸라코이드는 엽록체 전반에 걸쳐 여러 부분에서 3~7막이 중첩되어 초기 grana를 형성하였으며(Fig. 3) 출엽 후 17일에는 틸라코이드들이 좀 더 많은 부분에서 3~11막이 중첩되어 전형적인 grana를 형성하였다(Fig. 4). 출엽 후 28일에는 엽록체 전반에 걸쳐서 틸라코이드의 수가

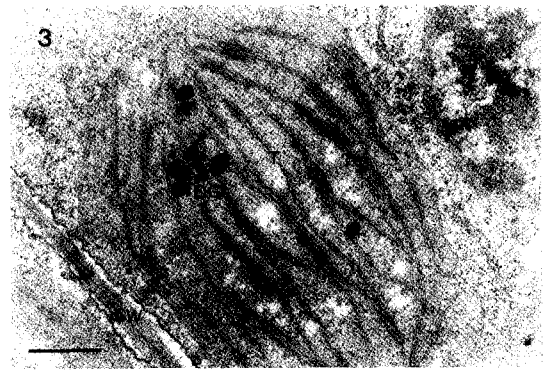

Fig. 3. Chloroplast of ginseng leaf of 10 days after emergence. Thylakoid membranes start to form grana structure. G : grana, Bar = 0.5 μm.

Fig. 4. Chloroplast of ginseng leaf of 17 days after emergence. The number of thylakoid membranes increases further, and the membranes constitute typical grana structure. Bar = 0.5 μm.

Fig. 5. Chloroplast of ginseng leaf of 28 days after emergence. The number of grana stacks increases, and the chloroplast is fully mature. Bar = 0.5 μm.

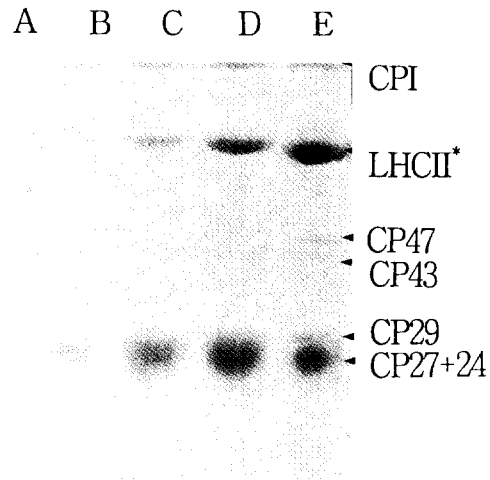

Fig. 6. CP-complex patterns by SDS-PAGE separation of thylakoid membrane proteins in 5 growing steps: (A) just emerging leaves, (B) 3, (C) 10, (D) 17 and (E) 28 days after emergence, respectively.

증가하였으며 grana stack의 수도 증가하였다(Fig. 5).

일반식물에서 초기 엽록체의 발달은 광노출 이전과 이후의 과정으로 구분된다. 먼저 광노출 이전 상태의 엽록체의 내막은 소포를 형성하며 선상으로 연결하여 prolamellar body를 형성한다. 그후 광에 노출되면 prolamellar body는 해체되고 소포들은 신장하여 처음에는 조그만 막대 모양으로 붙어서 선상의 틸라코이드를 이룬다. 그 이후 광노출되는 시간에 비례하여 틸라코이드의 수가 증가하며 중첩되어 초기 grana를 형성한다.[1,3,4] 인삼의 경우 일반식물의 엽록체 발달 과정과 비교하였을 때 그 과정은 유사한 결과를 보여 광은 엽록체 발달의 시발 요인이 되었고 광에 노출된 기간에 비례하며 성숙하였으나 시기적으로는 느린 발달을 보였다. 인삼의 경우에는 grana의 형성 시기가 2,000 ft-c의 광을 조사한 후 48시간이라는 보고가 있었고[8] 양지식물인 보리의 경우 광을 조사한 후 6시간 이후로 보고되었다.[12] 본 실험에서도 grana의 형성 시기가 출엽 후 10일 이후임에 미루어 양지식물과는 달리 엽록체의 성숙이 느린 것으로 사료된다.

2. 틸라코이드 막 단백질의 변화

인삼잎 엽록체의 발달 단계별로 틸라코이드 막 단백질을 분리하여 그 변화 과정을 관찰하였다. Octylglucoside를 detergent로 하여 SDS-PAGE로 분리한 결과 염색하지 않았을 때 엽록소가 결합된 6개의 CP-complex band들이 잎의 성장 단계별로 순차적으로 분리되었다. 이 녹색의 band들은 Camm과 Green[10]의 명명법에 따라 oligomeric light harvesting chlorophyll protein complex of PS II(LHC II*), CP 47, CP 43, CP 29, CP 27, CP 24로 구분하였다(Fig. 6). 그후 이들을 coomassie blue로 염색하여 단백질의 전기영동 pattern를 laser densitometer로 scanning하여 비교 관찰하였다(Fig. 7).

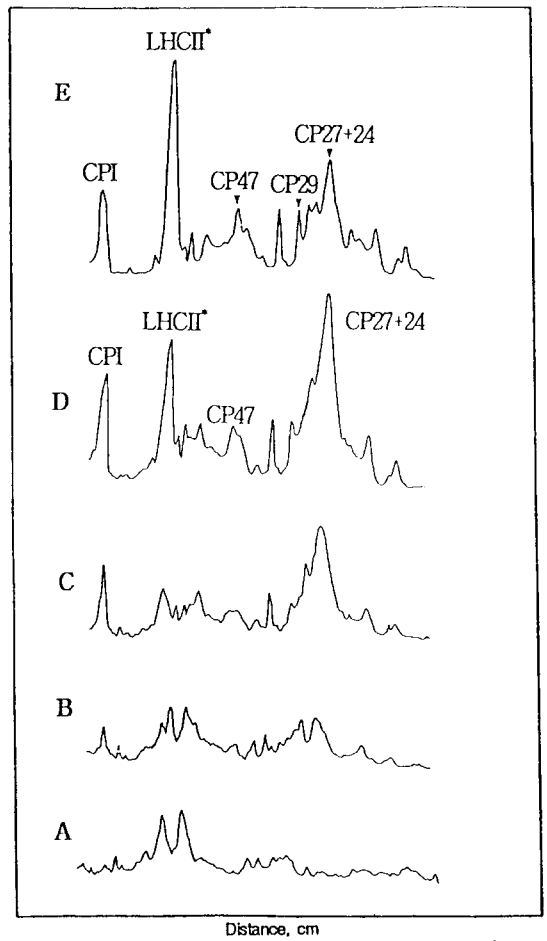

Fig. 7. Densitometric scans of thylakoid membrane polypeptides separated by SDS-PAGE in 5 growing steps: (A) just emerging leaves, (B0 3, (C) 10, (D) 17 and (E) 28 days after emergence, respectively.

잎이 지표면으로 출엽 직후 상태에서는 틸라코이드 막 단백질들은 엽록소 분자가 결합되지 않아 뚜렷한 CP-complex를 형성하지 못하고(Fig. 6-A) 다양한 minor band들로 관찰되었다(Fig. 7-A). 따라서 이 시기는

광에 충분히 노출되지 못하여 엽록소의 생합성이 개시되지 않은 상태라 생각된다. 출엽 후 3일에는 protein complex에 약간의 엽록소가 결합된 CP I, CP II complex가 희미하게 관찰되었으며(Fig. 6-B), 출엽 후 10일에는 엽록소가 결합된 LHC II*가 출현하여 CP I, LHC II*, CP II complex (CP 29+27+24)로 분리되었다(Fig. 6-C). 출엽 후 17일에서는 CP 47, CP 43의 출현을 희미하게나마 관찰할 수 있었다(Figs. 6-D, 7-D). 출엽 후 28일에서는 모든 CP-complex들에 더 많은 양의 엽록소가 결합되어 생리적으로 활성을 갖는 PS I과 PS II의 단백질들인 CP I, LHC II*, CP 47, CP 43, CP 29, CP 27+24로 분리되었다(Figs. 6-E, 7-E). 이러한 현상은 엽록체가 성숙됨에 따라 뚜렷이 구분되었다.

광합성의 명반응은 antenna 색소에 의해 흡수된 광에너지에 의해 유도되고 reaction center(P_{700}, P_{680})로 이동이 된다. 녹색 식물에서 광을 흡수하는 색소는 엽록소 a이고 엽록소 b와 카로티노이드와 같은 accessory 색소들은 광에너지를 엽록소 a로 전달해 주는 기능을 하고 있는데[5,13] 엽록소들은 각 protein complex안의 특정 부위에 비공유 결합으로 결합하여 CP-complex를 형성한다.[14] 각 CP-complex의 생성 시기는 식물체의 종에 따라 다르며, 빛이 조사된 시간에 따라 다르다는 보고가 있었다.[14-16] 박 등[8]은 인삼에서 CP I complex와 LHCP의 생합성 시기는 광도 2,000 lux의 광이 조사된 후 12시간 이후라고 보고하였고, Yamamoto 등[14]은 녹조류에서 CP I, LHC II의 출현 이후 뒤늦게 CP 47과 CP 43이 출현한다고 보고하였다.

본 실험의 결과에 의하면 출엽 직후에는 광노출 시간이 충분하지 않아 엽록소가 합성되지 않는 잠복기로 생각되어 CP-complex를 관찰할 수 없었고(Fig. 6-A) 그 후 빛에 일정 시간 노출된 후인 출엽 후 3일 이후부터 약간의 엽록소가 결합된 CP I과 CP II를 관찰할 수 있어 엽록소의 생합성이 개시되기까지는 일정 시간의 광노출 기간이 선행되어야 함을 알 수 있었다. 광계 II의 집광성 단백질인 LHC II는 출엽 후 10일 정도에 출현한 것으로 미루어 CP I, CP II 보다 뒤늦게 생합성되는 것으로 추정할 수 있다. 또한 CP 47과 CP 43은 녹화 초기에는 불안정하였고 엽록체가 완전히 성숙된 출엽 후 28일에 안정에 이르렀다. 이러한 CP-complex들의 형성은 엽록체가 성숙함에 따라 CP I, CP 47, CP 43, LHC II*, CP 29, CP 27+24 등으로 뚜렷이 분리되어 각 CP-complex들의 출현은 광에 노출된 시간 별로 차이를 보였다. 출엽 직후에서 CP-complex가 형성되지 않고(Fig. 6-A), minor band들로 관찰되는 현상(Fig. 7-A)은 미세구조적 측면에서 엽록체가 출엽 직후 grana를 형성하지 못한 미성숙 상태의 엽록체로 관찰되는 현상(Fig. 1)과 동일한 결과를 보였다. 특히 grana stack에 집중적으로 분포하고 있다고 알려진 가장 풍부한 틸라코이드 막 단백질인 LHC II[17]의 출현은 인삼잎이 광에 노출되어 일정한 시간이 경과된 출엽 후 17일 이후부터 뚜렷하여(Figs. 6-D, 7-D) 미세구조적 측면에서의 전형적인 grana stack이 형성되는 시기(Fig. 4)와 일치하였다. 이상의 결과들로 미루어 CP-complex의 생합성과 grana의 형성은 광에 의해 유도되며 광에 노출된 기간에 비례하여 단계적으로 발달하였고 시기적으로는 상호 연관되어 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

인삼잎의 발달 과정을 5단계로 구분하여 엽록체의 미세구조 변화 및 틸라코이드 막 단백질 생합성과의 시기적인 연관 관계를 밝히고자 하였다. 인삼잎이 발생하여 성숙되는 과정에서 지표면으로 출엽한 직후의 엽록체의 틸라코이드는 작은 막대 모양으로 연결되어 엽록체의 장축 방향으로 3~4열 선상으로 배열하였다. 그후 출엽 10일에는 초기 grana를, 17일에는 전형적인 grana를 형성하였고 28일에는 성숙한 엽록체로 발달하였다. 틸라코이드 막 단백질은 출엽한 직후에는 엽록소가 결합하지 않는 다양한 minor band들로 관찰되었고 출엽후 10일에는 LHC II, 17일에는 CP 47과 CP 43이 출현하였다. 28일에서는 PS I과 PS II의 단백질들인 CP I, LHC II, CP 47, CP 43, CP 29, CP 27+24로 뚜렷이 분리되었다. Grana stack에 집중적으로 분포하고 있는 집광성 단백질인 LHC II의 출현은 출엽후 17일에 뚜렷하여 전형적인 grana stack이 형성되는 시기와 시기적으로 일치하였다.

인 용 문 헌

1. Henningsen, K. W. and Boynton, J. E. : *J. Cell Biol.*, **44**, 290 (1970).

2. Virgin, H. I., Kahn, A. and Wettstein, D. V. : *Photochem and Photobiol.*, **2**, 83 (1963).
3. Degreef, J., Butler, W. L. and Roth, T. F. : *Plant Physiol.*, **47**, 457 (1976).
4. Lee, S. H., Cho, Y. D., Hong, Y. N. and Kwon, Y. M. : *Korean Biochem. J.*, **15**, 141 (1982).
5. Bassi, R., Hansen, G. H., Barbato, R., Giacometi, G. M. and Simpson, D. J. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 13333 (1987).
6. Olive, J. and Vallon, O. : *Electron microscopy Tech.*, **18**, 360 (1991).
7. Dunahay, T. C. and Staehelin, L. A. : *Plant Physiol.*, **78**, 606 (1985).
8. Park, I. H., Hong, Y. N., Kwon, Y. M., Lee, S. H. and Cho, Y. D. : *Korean Biochem J.*, **15**(1), 65 (1982).
9. Camm, E. L. and Green, B. R. : *Plant Physiol.*, **66**, 428 (1980).
10. Camm, E. L. and Green, B. R. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **974**, 180 (1989).
11. Laemmli, U. K. : *Nature* **227**, 680 (1970).
12. Lee, S. H., Ikeda, M. and Yamada, Y. : *J. Agr. Kyushu Univ.*, **22**, 65 (1977).
13. Melis, A. and Harvey, G. W. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **637**, 360 (1991).
14. Yamamoto, Y., Mizobuchi, A., Hiramatsu, H. and Shioi, Y. : *Pysiologia Plantarium*, **84**, 403 (1992).
15. Albert, R. S., Thornber, J. P. and Nayler, A. W. : *J. Exp. Bot.*, **23**, 1060 (1972).
16. Mader, P., Chlad, F., Chladov, J., Novak, V., Sofrava, D., Naus, J., Kohlova, V., Svabova, M. and Makovee, P. : *Photosynthetica*, **14**, 222 (1980).
17. Thornber, J. P. : *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 127 (1975).