

발달단계에 따른 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 배유세포의 Legumin에 대한 면역세포화학적 분포

李 昌 燮 · 金 宇 甲

Immunocytochemical Localization of Legumin with Developing Stages of Ginseng Endosperm Cells

Lee, Chang Seob and Woo Kap Kim

(Received March, 1995)

ABSTRACT

Legumin was purified from the endosperm cells of the ginseng seed and analyzed its characteristics. Distributional patterns of the legumin in the endosperm cells were identified using the immunocytochemical method. Legumin was glycoprotein composed of two subunits, molecular weights about 33,000 and 25,000 respectively. The molecular shape of purified legumin stained negatively seems to have hexagonal structure about 10 nm in size. It was localized at the rER, dictyosomes, and in the vacuoles at the early developing stage. Legumin was glycosylated in the dictyosomes and transported from the dictyosomes to the vacuoles. Legumin was accumulated into the central vacuole via the dictyosomes while the endosperm cells were developing. The amorphous proteins containing legumin were scattered randomly within the central vacuoles, which were aggregated together and became gradually spherical shape. Legumin was distributed within the globular protein bodies in the endosperm cells of matured seed. However legumin was not found in the globoids located in the protein bodies.

서 론

식물의 단백질은 구조 단백질, 대사 단백질 및 저장 단백질의 세 가지 유형으로 구별된다. 구조 단백질은 일반적으로 고분자이며 불용성으로서 glutelin과 extensin 등이 이에 속하며, 대사 단백질은 가용성으로서 효소와 lectin 등이 이에 속한다. Higgins(1984)는 저장 단백질이 발달 중인 종자에 축적되었다가 발아시 유식물의 생장에 필요한 질소원을 공급하기 위해 급격히 가수분해된다고 하였다. Spencer와 Higgins(1979)는 콩과식물의

종자에 대한 연구로부터 저장 단백질은 종자의 단백질체 (protein bodies)에 분포한다고 하였으나 Derbyshire 등(1976)은 종자의 저장 단백질이 단백질체 이외에도 분포하는 것을 확인하였다.

유배유 종자의 저장 단백질들은 배유세포의 조면소포체에 부착된 폴리솜에서 합성된 다음 액포로 수송되어 단백질체라고 하는 불용성 집합체를 형성하는 것으로 알려져 왔고(Craig and Miller, 1984; Greenwood and Chrispeels, 1985; Lending *et al.*, 1989; Sturm *et al.*, 1988), Craig와 Miller(1980)는 단백질체가 매우 크고 분화된 중앙액포에서 유래된다고 하였다.

Baumgartner 등(1980)은 강남콩(*Phaseolus vulgaris*)의 자엽에서 디티오솜이 단백질의 수송에 관여하는 증거가 충분하지 않다고 하였고 Yu와 Kim(1991)도 인삼 배유에서 디티오솜이 단백질체의 형성에 관여하는 것을 관찰하지 못하였으나 Yu 등(1988)은 디티오솜이 단백질의 수송에 관여하는 것으로 추정하였다. 그러나 이와같은 미세구조적 관찰만으로는 직접적인 증거가 부족하여 저장 단백질의 수송에 있어 디티오솜의 역할은 계속 논란이 되어 왔다.

이상에서와 같이 여러 식물 종자의 저장 단백질에 관한 많은 연구가 이루어져 왔으나, 인삼종자의 배유세포 내의 단백질체에 대하여는 미세구조적 측면에서 연구되었을 뿐(Kim, 1984; Kim *et al.*, 1979; Yu *et al.*, 1988; Yu and Kim, 1992), 저장 단백질의 성분에 대해서는 Lee 등(1992)의 연구 이외에는 찾아보기 힘들다. 따라서 본 연구에서는 인삼종자의 저장 단백질중 legumin을 이용하여 그 생리적 특성을 밝힘과 동시에 legumin에 대한 면역세포화학적 방법을 적용하여 legumin의 생합성에 있어 조면세포체와 디티오솜의 연관 관계 및 발달 단계에 따른 legumin의 분포양상을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 단백질 추출용 재료는 자경의 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 종자에서 종피를 제거하고 해부 현미경 하에서 배 부분을 잘라 낸 후 배유만을 냉동 보관하면서 사용하였다. 현미경 관찰재료는 4년생 또는 5년생 자경의 인삼종자를 개화 이후 홍숙되어 채종할 때까지 수시로 채집하여 종피를 제거한 후 해부현미경 하에서 배유조직편을 채취하였다.

Legumin 분리 정제 Bollini와 Chrispeels(1978) 및 Casey(1979) 등의 방법을 변형하여 냉동 보관해둔 배유에서 단백질을 추출하였다. 배유 1g 당 20 mM sodium borate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, pH 9.0) 8 ml를 미리 냉각시켜 둔 막자사발에 넣어 균질화 시킨 후 1시간 동안 얼음위에서 교반하였다. 이를 10,000 Xg로 10분간 원심분리한 후 상등액은 냉장보관하고, 침전물은 g당 4 ml의 sodium borate로 재추출하였다. 이렇게 추출한 상등액을 서로 모아 얼음위에서 교반시키면서 ammonium sulfate를 조금씩 가하여 40% 포화용액을 만들어 약 1시간 교반시킨 다음 5,000 Xg로 10분간 원심분리하였다. 이 상등액에 ammonium sulfate를 가하여 70%

포화용액을 만들고, 약 1시간 교반시킨 후 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 25 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 용해시켰다. 이 추출물을 Sephadex G-50 (Pharmacia) 컬럼에 통과시켜 저분자량의 단백질 및 ammonium sulfate를 제거하였다. 즉, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 (buffer A)로 equilibrate시킨 Sephadex G-50 컬럼(1.5 cm I.D.×95 cm length)에 단백질 추출물을 넣고 buffer A를 1분당 0.3 ml의 속도로 내려보내면서 일정 간격으로 분획을 받았고, 이중 우유빛의 분획을 따로 모았다. 이 분획을 diethylaminoethyl(DEAE)-셀룰로스(DEAE-DE52, Whatman) 크로마토그래피를 하여 NaCl 농도구배에 따른 단백질 분획을 얻었다. 즉, buffer A로 equilibrate시킨 DEAE-셀룰로스 컬럼(2.5 cm I.D.×20 cm length)에 단백질 추출물을 넣고 0~400 mM의 NaCl linear gradient를 통하여 먼저 나온 peak의 단백질 분획을 legumin의 정제에 사용하였다. Legumin 분획을 DEAE-셀룰로스 컬럼에 통과시키면서 0, 150 및 300 mM의 NaCl step gradient를 이용하여 먼저 나오는 peak의 단백질 분획을 받았다. 이 분획을 1L의 buffer A에 8시간 투석시키면서 buffer를 자주 교환하여 NaCl을 제거한 후, centriprep-30 농축기(Amicon)로 3,000 Xg에서 원심분리하여 농축시켜 eppendorf tube에 소량씩 분주하여 deep-freezer에 보관하고 하나씩 사용하였다.

전기영동적 분석 Legumin을 native-gel(7%)로 전기영동한 다음 0.25% coomassie brilliant blue R 250으로 염색하여 각 단백질의 순수도를 분석하였고, periodic acid-schiff(PAS) 염색방법으로 탄수화물의 존재여부를 확인하였다. 또한 Laemmli(1970)법에 따른 sodium dodecyl sulfate(SDS)-gel(12.5%)로 전기영동하여 구성 소단위의 종류 및 분자량을 분석하였다.

항체 형성 Legumin에 대한 항체는 분자량이 큰 소단위를 토끼에 주사하여 만들었다. 즉, 정제한 legumin을 SDS-polyacrylamide gel상에서 전기영동하여 이를 Towbin 등(1979)의 방법으로 SDS-gel상의 legumin의 구성 소단위들을 니트로셀룰로스 필터에 옮겼다. 이를 Ponceau S (Sigma)로 염색하여 구성 소단위의 띠를 확인한 다음 분자량이 큰 소단위의 띠를 가위로 오려내어 phosphate buffer (25 mM, pH 7.2)로 탈색시키고 니트로셀룰로스 필터를 가위로 잘게 썰어 액체질소가 든 막자사발에 넣고 곱게 균질화하였다. 이것을 소량의 phosphate buffer (25 mM, pH 7.5)를 사용하여 모아서

Freund's complete adjuvant (Difco)와 동량으로 혼합하여 격일로 3회 주사하고 1주 후에 다시 주사한 다음, 2주후 Freund's incomplete adjuvant와 동량 혼합하여 등쪽의 여러 곳에 마지막 피하주사를 하였다. 1주일 경과 후 토끼의 귀 끝 1/3 부근의 정맥에서 소량을 시험 채혈하여 항체형성 여부를 확인하였다. 항체가 형성되었으면 마지막 주사 후 2주 째에 채혈하여 원심분리로 항혈청을 취하였다. 토끼에 단백질을 주사하기 전에 소량의 preimmune serum을 채취하여 면역반응시 대조구조로 사용하였다.

Affinity 크로마토그래피 토끼에서 얻은 항혈청에 ammonium sulfate를 서서히 가하며 교반시켜 40% 포화용액으로 만든 후 10,000 Xg에서 10분간 원심분리시켜 상등액을 취하고, 다시 ammonium sulfate를 가하여 75%의 포화상태로 만들어 재원심분리하여 침전물을 취하였다. 이를 desalting column (Bio-Rad)에 통과시켜 ammonium sulfate를 제거한 후 DEAE Affi-Gel Blue affinity 크로마토그래피 (Bio-Rad)를 통하여 immunoglobulin G (IgG)를 분리하였다. 이 IgG를 Western blotting 및 면역세포화학적 연구에 사용하였다.

Western Blotting Towbin 등(1979)의 방법으로 SDS-gel상의 legumin을 니트로셀룰로스 필터에 옮기고, 여기에 각 단백질에 대한 항체 (희석비율 1 : 100)와 peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Sigma, 희석비율 1 : 1000)를 반응시키고 diaminobenzidine (DAB)을 기질로 처리하여 면역반응을 수행하였다.

EM-Negative Staining Legumin을 Troncoso 등(1990)의 방법으로 negative stain하여 구조를 관찰하였다. 즉, 순수 분리한 legumin을 콜로디온 막을 입힌 그리드에 소량 떨어뜨려 건조시킨 후 phosphotungstic acid 또는 uranyl acetate로 negative stain하여 legumin의 전자현미경적 구조를 관찰하였다.

미세 구조 관찰 방법 종자에서 추출한 배유조직 소편을 Craig와 Miller(1984)의 방법에 따라 3% glutaraldehyde (25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.1)에 2시간 단일고정하거나 glutaraldehyde 및 1% osmium tetroxide(1시간)로 이중고정하고, sodium phosphate buffer (25 mM, pH 7.1)로 20분 간격으로 3회 세척하여 에탄올-아세톤 농도상승 순으로 탈수한 다음, Spurr 포매액으로 포매하였다. 포매한 블럭을 LKB-V형 ultramicrotome으로 잘라 은색 절편을 취하

여 uranyl acetate와 lead nitrate로 염색하여 JOEL JEM 100 CX-II 투과 전자현미경 (80 kV)으로 미세구조를 관찰하였다.

면역세포화학적 방법 은색 절편을 콜로디온 막을 입힌 니켈 그리드에 부착시킨 다음 절편이 아래쪽을 향하게 하여 20 μ l의 PBST-BSA (15 mM, pH 7.1, 0.2% Tween-20, 1% bovine serum albumin) 위에 20분 동안 띄워 blocking시키고, 20 μ l의 항 legumin 항체 (희석비율 ; 각각 1 : 100)에서 30~40분 동안 반응시킨 후 buffer에 띄워 세척하였다. 이를 30 nm의 금입자가 결합된 goat anti-rabbit antibody (GAR-G30; Janssen Pharmaceuticals, 희석비율 1 : 20)에서 30분 동안 반응시킨 다음 PBST와 D.W로 세척하고 uranyl acetate 단일염색을 하여 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

Legumin의 분리 정제 인삼 배유세포에서 sodium borate로 추출한 단백질을 DEAE-셀룰로스 크로마토그

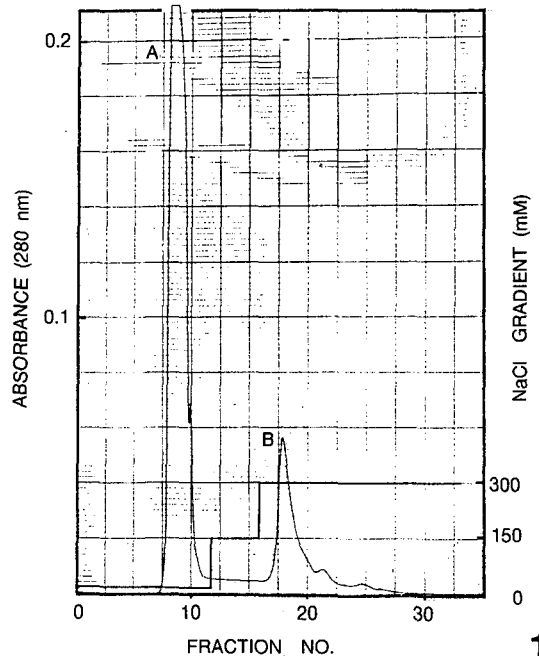
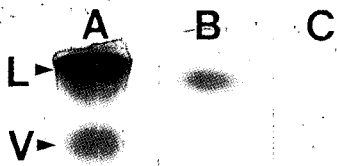
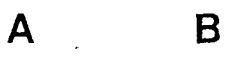


Fig. 1. Fractionation of legumin in extract solution of ginseng endosperm collected from DEAE cellulose column pass. Proteins were eluted with a step gradient from 0 to 0.3 M NaCl. Peak A represents the legumin fraction.



2



3

4

Fig. 2. Proteins analysis by native-PAGE. A-B, CBB staining gel; C, PAS staining gel. A,C: Fraction of sephadex column (Globulin). B: Legumin fraction of DEAE-cellulose column (Peak A of Fig. 1).

Fig. 3. Separation of legumin by SDS-PAGE. A; Fraction of sephadex column. B; Purified legumin.

Fig. 4. This showed Western transblot that probes the large subunit of legumin by antibodies against the legumin subunit.

래피를 통하여 두 가지의 단백질 분획을 얻었다. 첫번째 단백질의 peak는 NaCl 농도구배가 낮은 곳에서 나타나며, 두번째 단백질의 peak는 250~300 mM 되는 곳에서 나타났다. 첫번째 peak의 단백질을 취하여 0, 150, 300 mM의 NaCl step gradient로 이온 교환 크로마토그래피를 반복하여 legumin을 순수 분리하였다(Fig. 1).

Legumin의 분석 순수 분리한 legumin을 native-polyacrylamide gel로 전기영동하고 coomassie brilliant blue로 염색하여 분석한 결과 각각 단일한 띠로 나타나 이들 단백질이 순수하게 분리되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 탄수화물의 존재를 확인하기 위한 PAS 반응의 결과, 양성반응을 보여 legumin이 당단백질로 확인되었다(Fig. 2). 또한 SDS-PAGE 결과 legumin은 분자량이 33,000 및 25,000인 두 가지 소단위로 구성되어 있으며, gel상에서 이 두 소단위의 띠의 넓이와 염색성이 서로 비슷한 것으로 보아 legumin의 두 소단위가 거의 같은 비율로 구성되어 있는 것으로 추정된다(Fig. 3).

항 Legumin 항체 형성의 확인 및 분리 항 legumin 항체에 대한 Western blotting 결과 단일한 띠로 나타나 항체가 형성되었음을 알 수 있었다(Fig. 4). Legumin에 대한 항체의 형성을 확인한 후 legumin의 항혈청으로부터 IgG를 순수 분리하였다(Fig. 5).

Legumin의 전자현미경적 분자 구조 순수 분리한 legumin을 negative stain하여 전자현미경으로 관찰한 결과, legumin의 분자들은 크기가 10 nm의 육각구조로서 규칙적인 배열을 하고 있었다(Fig. 6). legumin 분자들은 배열방식에 따라 띠 모양으로 관찰되기도 하는데 이러한 모습들은 미세구조 관찰시 홍숙종자의 배유세포에서 간혹 관찰되는 단백질 결정 구조와 유사한 양상으로 나타났다(Fig. 7).

전자현미경적 관찰 Legumin의 분포를 확인하기 위하여 금입자를 표지시킨 결과, 금입자는 전자밀도가 높은 물질에 표지되어 이 물질들이 legumin을 포함하고 있는 단백질로 판명되었다(Figs. 8~20). 발달초기의 배유세포에서 legumin은 조면소포체와 주변의 소낭 및 액포에 분포하여 legumin이 조면소포체의 폴리솜에서 합성되는 것으로 확인되었다(Figs. 8~12). 또한 legumin은 딕티오솜의 말단부와 딕티오솜에 인접한 단백질에도 분포하고 있었으며 배유세포가 발달함에 따라 점차 딕티오솜로부터 이행하여(Fig. 13, 14) 핵 근처의 중앙 액포에 나타나기 시작하였다(Fig. 16). 따라서

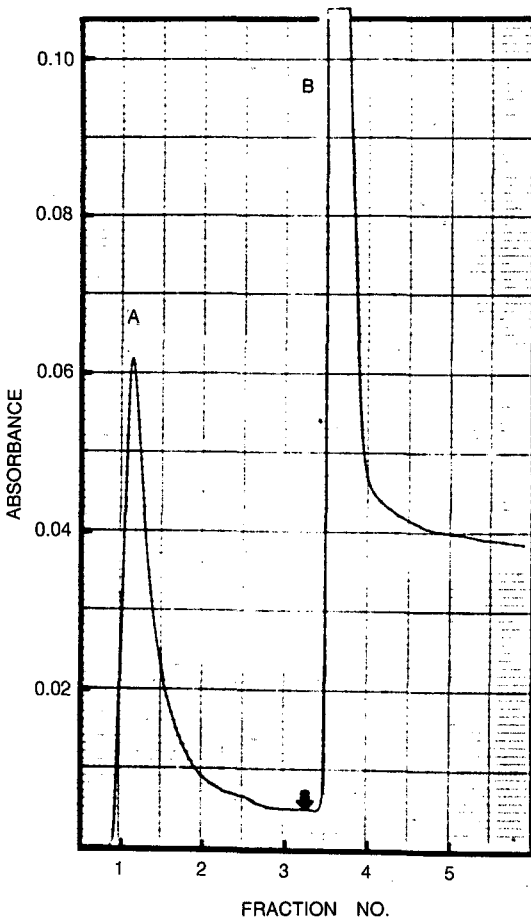


Fig. 5. This affinity chromatograph showed the existence of pure antibody on the DEAE Affi-Gel Blue gel. Peak A represents IgG and peak B other serum proteins. The arrow was the time point of buffer exchange.

legumin이 조면소포체에서 액포로 수송되는 과정에 디티오솜을 경유하는 것으로 나타났다. 금입자는 액포에 축적되어 있는 $0.1\sim 0.25\ \mu\text{m}$ 크기의 아주 작은 단백질에도 특이적으로 표지되어 legumin이 분포하고 있음을 보여 주었다(Fig. 15).

발달중의 배유세포에는 조면소포체와 디티오솜 등의 소기관들은 감소하는 반면 중앙액포에는 legumin이 점차 증가하여 핵 주변에 무질서하게 분포되어 있었고(Fig. 17), 배유세포가 점차 성숙함에 따라 무정형의 단백질들은 서로 모여 여러 개의 그룹으로 나타났다(Fig. 18). 홍숙되기 직전의 배유세포에서는 그룹을 이룬 단백질들이 점차 구형을 이루게 된다(Fig. 19). 배유세포의

중앙액포에 구형의 모습을 갖춘 단백질들은 종자가 홍숙될 때 비로서 legumin을 포함한 구형의 단백질체를 이루게 된다(Fig. 20). 이로부터 조면소포체와 디티오솜 주변에 분포하고 있던 단백질들이 중앙액포에 축적됨으로써 단백질체를 형성하는 것을 알 수 있었다.

홍숙종자의 배유세포에는 구형 또는 타원형의 단백질체가 $1\sim 8\ \mu\text{m}$ 의 다양한 크기로 핵 주변에 고루 분포되어 있으며 지질을 함유한 스피어리소솜에 둘러싸여 있다(Fig. 20). Legumin은 단백질체내에 고루 분포하고 있지만 단백질체내에 위치한 구상체에는 분포하지 않은 것으로 나타났다.

홍숙종자의 배유세포에는 폭이 4 nm의 밝고 어두운 띠들이 교대로 배열되어 있는 격자무늬의 단백질 결정 구조가 관찰되었는데, 이는 순수 분리한 legumin을 negative stain하였을 때 나타나는 단백질 결정 구조와 유사하였다(Fig. 7).

고 찰

Legumin의 특성 Legumin은 식물의 종과 연구자에 따라 구성 소단위의 종류와 분자량에 있어 다소 차이가 나타난다. 완두(*Pisum sativum* L)의 경우 Higgins와 Spencer(1977)는 legumin이 분자량 38,500과 20,000의 두 가지 주요 소단위로 구성되어 있다고 하였으나, Casey(1979)에 의하면 완두의 legumin 구성 소단위는 완두의 종류에 따라 다양하게 구성되어 있으며, 주요 구성 소단위의 분자량은 대략 40,000과 20,000이지만 그 이외에 90,000, 70,000, 45,000 및 30,000의 소단위도 소량 존재한다고 하였다. Citharel과 Citharel(1985)은 야생 콩(*Cytisus scoparius* L(Link.))의 경우 legumin이 분자량 62, 52, 51, 23, 22 kDa의 소단위로 주로 구성되어 있으나, 그 이외에 90, 68, 36, 34 kDa의 소단위도 소량 포함되어 있다고 하였다. 인삼 종자의 legumin은 두 가지의 소단위로 구성되어 있고 각 소단위의 분자량은 33,000 및 25,000이었으며, 두 구성 소단위가 거의 같은 비율로 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 legumin이 두 가지 소단위로 구성되어 있다는 점에서 완두의 경우(Casey, 1979; Higgins and Spencer, 1977)와 일치하였으나 분자량에 있어서는 다소 차이가 있었다.

한편, 탄수화물의 존재를 확인하기 위하여 native-gel 상에서 PAS 반응을 시킨 결과 legumin이 양성반응을

나타내어 이 두 가지 단백질이 탄수화물과 결합된 당단백질임을 알 수 있었다. 그러나 legumin이 당단백질이라는 점에 대하여는 상반된 견해가 있다. 즉, 완두의 경우 legumin에 상당한 수준의 glycosylation이 일어나 있다(Basha and Beevers, 1976; Davey and Dudman, 1979)는 견해가 있는 반면, legumin에 탄수화물이 전혀 결합되어 있지 않다(Casey, 1979; Gatehouse *et al.*, 1980; Hurkman and Beevers, 1980; Jones *et al.*, 1981)는 견해도 있어 논란이 되어 왔다. 인삼의 경우에는 legumin이 당단백질로 확인되어 Basha와 Beevers (1976) 및 Davey와 Dudman(1979)의 견해와 일치하였다.

배유세포에서의 Legumin 분포 발달중인 종자의 전자현미경 관찰을 통하여 Dieckert와 Dieckert(1972, 1976)는 조면소포체로부터 단백질체로의 단백질 수송에 있어 디티오솜과 골지 기원의 소낭이 중심적 역할을 한다는 가설을 제안하였다. 이러한 제안은 단순히 디티오솜과 밀접하게 연결된 소낭에서 전자밀도가 높은 물질들이 존재하였고, 이와 유사한 물질들이 단백질체에서 발견되었다는 점에 근거하였다. 이러한 전자밀도가 높은 물질이 저장 단백질이라고 설명한 제안은 그 물질이 단백질 분해효소에 의하여 소화됨으로써 더욱 확고해졌다. 그러나 저장 단백질의 수송에 있어 디티오솜의 역할은 직접적인 증거 부족으로 인해 계속 논란이 되어 왔다.

Nieden 등(1984)은 면역세포화학적 연구로부터 *Vicia faba* 종자의 legumin이 초기 발달 단계의 액포에 있는 단백질 퇴적물 및 조면소포체와 연관되어 있다고 하였다. 더욱이 legumin은 dictyosome과 dictyosome에서 기원한 소낭뿐만 아니라 시토플라에 분포되어 있는 단백질이 포함된 소낭에도 분포하는 것으로 확인되어, 콩의 저장 globulin이 조면소포체로부터 단백질체의 저장장소까지 수송되는 과정에 dictyosome이 관여한다는 것을 밝혀냈다. Boulter 등(1987)도 완두에서 legumin이 막에 싸인 단백질체에 축적된다고 하였다. 발달 초기의 인삼 배유세포에서도 legumin은 조면소포체의 폴리솜에서 생합성되어 액포내로 유입되었다. 그리고 legumin이 액포로 수송되는 과정에 디티오솜을 경유하는 것으로 나타나 Nieden 등(1984)의 결과와 일치하였다. 한편, 순수 분리한 legumin을 전기영동하여 PAS 반응을 시켰을 때 양성으로 나타난 결과와 면역세포화학적 연구를 통하여 legumin이 디티오솜을 경유하는 것으

로 나타난 결과로부터 legumin이 glycosylate되어 있음을 알 수 있었다.

발달중인 완두의 자엽에 대한 광학현미경적 관찰과 미세구조적 관찰로부터 단백질체가 저장유세포의 중앙액포에서 기원한다는 것을 알게 되었다(Chrispeels, 1985; Craig *et al.*, 1979, 1980; Craig and Millerd, 1980; Larkins, 1981). 저장 단백질의 축적은 중앙액포의 점진적인 분할과 동반하여 일어남으로써 무수한 단백질체를 이루게 되며, 또한 곡류와 콩과식물, mung bean 및 *Vicia faba* 등에서는 조면소포체의 폴리솜에서 합성된 단백질이 액포에 축적된다(Bailey *et al.*, 1970; Bollini and Chrispeels, 1979; Briarty *et al.*, 1969). 인삼의 경우에도 마찬가지로 조면소포체의 폴리솜에서 합성된 단백질이 액포로 유입되어 축적되었다. 한편 Mifflin 등(1980)은 서로 다른 곡류와 완두의 단백질체 형성에 관한 비교 연구로부터 콩과식물의 단백질체는 액포에서 기원하는 반면, 밀, 옥수수 및 보리의 단백질체는 소포체에서 기원한다고 하였다. Pernollet(1978) 및 Weber와 Neumann(1980) 등은 몇몇 쌍자엽식물의 경우 단백질이 소포체에서 유래한 소낭에 축적된다는 가능성이 어느 정도 호황을 얻고 있으나 대부분의 증거들은 단백질체가 액포에서 유래된다고 하였다. 홍숙직전의 배유세포에는 legumin을 포함한 무정형의 단백질이 핵주위의 중앙액포에 위치하며 그 수도 점차 증가하여 핵 주변에 무질서하게 분포하지만 홍숙되어감에 따라 점차 구형의 단백질체의 형태를 나타내었다. 이러한 양상은 다른 종자에서 관찰된 바가 없어 특이하였다.

홍숙종자의 배유세포에는 액포에 단백질이 충만하게 됨으로써 형성된 단백질체가 비로소 나타나게 된다. 단백질체는 주로 구형 또는 타원형이며 1~8 μm 의 다양한 크기로서 핵 주변에 고루 분포되어 있으며 지질을 함유한 스피이러소솜에 둘러싸여 있는 것으로 관찰되어 Yu와 Kim(1992)의 결과와 일치하였다. 한편, Bailey 등(1970), Murray(1984) 및 Yu와 Kim(1991, 1992) 등은 단백질체의 형성이 거의 완료됨에 따라 조면소포체는 감소한다고 하였는데, 본 연구에서도 동일하게 나타났다. 따라서 성숙한 배유세포에는 핵과 무수한 단백질체와 스피이러소솜 및 소수의 미토콘드리아가 분포하고 있었으나 조면소포체, 디티오솜 및 색소체 등의 다른 소기관들은 거의 관찰되지 않았다. 발달중인 배유세포는 legumin이 조면소포체와 디티오솜 주변, 액포 및 중앙액포에 분포하고 있던 경우와는 달리, 홍숙종자의 배유

세포에는 세포전역에 위치한 커다란 단백질체에 분포하고 있어 Higgins와 Spencer(1977)의 견해와 일치하였다. 그러나 단백질체 내에 분포되어 있는 구상체에는 legumin이 포함되어 있지 않아 Le Gal과 Rey(1986)의 결과와 일치하였다.

Marsh와 Doyle(1985)은 붕어마름(*Phaeoceros laevis* Prosk)에서 모양과 크기가 일정하지 않은 단백질 결정체를 관찰하였는데, 결정체들의 종단면은 폭이 6 nm 인 밝고 어두운 띠들이 교대로 배열되어 있고 횡단면은 육각형의 격자구조를 나타낸다고 하였다. 홍숙종자의 배유세포에서도 격자무늬의 단백질 결정 구조가 관찰되었는데, 밝고 어두운 띠들의 폭은 4 nm인 것으로 나타났다. 한편 순수 분리한 legumin의 negative stain 결과, legumin 분자들은 크기가 10 nm인 육각형의 규칙적인 격자구조로 구성되어 있었으며 배열 방식에 따라 띠 모양으로 관찰되기도 하였는데 이는 배유세포의 단백질 결정 구조와 유사한 양상을 나타내었다.

결 론

인삼 종자의 배유세포에서 legumin을 분리 정제하여 그 특성을 밝히고, 면역세포화학적 방법으로 배유세포의 legumin 분포 양상을 확인하였다. Legumin은 33,000과 25,000의 두 가지 소단위로 구성되어 있는 당 단백질로서 순수 분리한 legumin의 negative stain 결과 legumin 분자는 10 nm의 육각구조로 나타났다. 배유세포의 발달초기에 legumin은 조면소포체와 디티오솜 주변 및 액포에 분포하였다. 디티오솜은 legumin의 수송 및 glycosylation에 관여한다. 배유세포가 발달함에 따라 legumin은 디티오솜을 경유하여 중앙액포에 축적되며, 중앙액포에 무질서하게 분포하던 legumin을 포함한 무정형의 단백질들은 점차 구형의 단백질체로 발달하였다. 홍숙종자의 배유세포에서는 legumin이 구형의 단백질체에 고루 분포하였으나, 단백질체내에 위치한 구상체에는 legumin이 분포하지 않았다.

참 고 문 헌

Bailey, C.J., A. Cobb and D. Boulter. 1970. A cotyledon slice system for the electron autoradiographic study of the synthesis and intracellular transport of seed storage protein of *Vicia faba*. *Planta* 95 :

103-118.

Basha, S.M.M. and L. Beevers. 1976. Glycoprotein metabolism in the cotyledons of *Pisum sativum* during development and germination. *Plant Physiol.* 57 : 93-97.

Baumgartner, B., K.T. Tokuyasu and M.J. Chrispeels. 1980. Immunocytochemical localization of reserve protein in the Endoplasmic Reticulum of developing bean (*Phaseolus vulgaris*) cotyledons. *Planta* 150 : 419-425.

Bollini, R. and M.J. Chrispeels. 1978. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 142 : 291-298.

Bollini, R. and M.J. Chrispeels. 1979. The rough Endoplasmic Reticulum is the site of reserve-protein synthesis in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons. *Planta* 146 : 487-501.

Boulter, D., I.M. Evans, J.R. Ellis, A.H. Shirsat, J.A. Gatehouse and R.R.D. Croy. 1987. Gene regulation in *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.* 25 : 283-289.

Briarty, L.G., D.A. Coult and D. Boulter. 1969. Protein bodies of developing seeds of *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 20 : 358-372.

Casey, R. 1979. Immunoaffinity chromatography as a means of purifying legumin from *Pisum*(pea) seeds. *Biochem. J.* 177 : 509-520.

Chrispeels, M.J. 1985. The role of the Golgi apparatus in the transport and post-translational modification of vacuolar (protein body) proteins. *Oxford Surveys of Plant Mol. Cell Biol.* 2 : 43-68.

Citharel, L. and J. Citharel. 1985. Protein bodies from the cotyledons of *Cytisus scoparius* L.(Link). Ultrastructure, isolation and subunit composition of albumin, legumin and vicilin. *Planta* 166 : 39-45.

Craig, S. and A. Millerd. 1980. Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons. III. Immunocytochemical localization of legumin and vicilin using antibodies shown to be specific by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aust. J. Plant Physiol.* 7 : 339-351.

- Craig, S. and C. Miller. 1984. LR White resin and improved on-grid immunogold detection of vicilin a pea seed storage protein. *Cell Biol. Int. Repts.* 8 : 879-886.
- Craig, S., J.D. Goodchild and A.R. Hardman. 1979. Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons. I. Qualitative and quantitative changes in parenchyma cell vacuoles. *Aust. J. Plant Physiol.* 6 : 81-98.
- Craig, S., D.J. Goodchild and C. Miller. 1980. Structural aspect of protein accumulation in developing pea cotyledons. II. Three-dimensional reconstructions of vacuoles and protein bodies from serial sections. *Aust. J. Plant. Physiol.* 7 : 329-337.
- Davey, R.A. and W.F. Dudman. 1979. The carbohydrate of storage glycoproteins from seeds of *Pisum sativum*: characterization and distribution on component polypeptides. *Aust. J. Plant Physiol.* 6 : 435-447.
- Derbyshire, E., D.J. Wright and D. Boulter. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochem.* 15 : 3-24.
- Dieckert, J.W. and M.C. Dieckert. 1972. The deposition of vacuolar proteins in oil seeds. In *Seed Proteins*. Inglett, G.E. Ed. p. 52-85. Avi Publishing Co., Westport, Connl.
- Dieckert, J.W. and M.C. Dieckert. 1976. The chemistry and cell biology of the vacuolar proteins of seeds. *J. Food Sci.* 41 : 475-482.
- Gatehouse, J.A., P.R.D. Croy and D. Boulter. 1980. Isoelectric focusing properties and carbohydrate content of pea (*Pisum sativum*) legumin. *Biochem. J.* 185 : 497-503.
- Greenwood, J.S. and M.J. Chrispeels. 1985. Immunocytochemical localization of phaseolin and phytohemagglutinin in the endoplasmic reticulum and Golgi complex of developing bean cotyledons. *Planta* 164 : 295-302.
- Higgins, T.J.V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 191-221.
- Higgins, T.J.V. and D. Spencer. 1977. Cell-free synthesis of pea seed proteins. *Plant Physiol.* 60 : 655-661.
- Hurkman, W.J. and L. Beevers. 1980. What is pea legumin-is it glycosylated? *Planta* 150 : 82-88.
- Jones, J.B., D. Spencer, T.J.V. Higgins and A. Miller. 1981. The role of glycosylation in storage-protein synthesis in developing pea seeds. *Planta* 153 : 201-209.
- Kim, W.K. 1984. Ultrastructural and histochemical studies of the ginseng seed mature endosperm cells. *Korean J. Electron Microscopy* 14 : 15-28.
- Kim, W.K., H.D. Park, E.S. Kim and S.S. Han. 1979. Ultrastructural changes during Germination of ginseng seeds (*Panax ginseng*). *Korean J. Electron Microscopy* 9 : 57-69.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Larkins, B.A. 1981. Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. In *Biochemistry of Plants, Vol 6: Proteins and nucleic acids*, Stumpf, P.K. and E.E. Conn. Ed. p. 449-489. Academic Press, Inc. New York, London.
- Lee, C.S., S.C. Yu and W.K. Kim. 1992. Immunocytochemical localization of vicilin in Endosperm cells of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Bot.* 35 : 99-106.
- Le Gal, M.F. and L. Rey. 1986. The reserve proteins in the cells of mature cotyledons of *Lupinus albus* var. *Lucky*. I. Quantitative ultrastructural study of the protein bodies. *Protoplasma* 130 : 120-127.
- Lending, C.R., R.S. Chesnut, K.L. Shaw and B.A. Larkins. 1989. Immunolocalization of avenin and globulin storage proteins on developing endosperm of *Avena sativa* L. *Planta* 178 : 315-324.
- Marsh, B.H. and W.T. Doyle. 1985. Intercellular protein crystals from the gametophyte-sporophyte junction of the hornwort *Phaeoceros laevis* Prosk. *Protoplasma* 129 : 223-226.
- Mifflin, B.J., S.R. Burgess and P.R. Shewry. 1980. The development of protein bodies in the storage tissues of seeds subcellular separation of

- homogenates of barley, maize and wheat endosperms and of pea cotyledons. *J. Exp. Bot.* 32 : 199-219.
- Murray, D.R. 1984. Accumulation of seed reserves of nitrogen. In *Seed Biology*, Vol. 1: Development, Murray D.R., Ed. p. 108-117. Academic Press, London.
- Niden, U.Z., R. Manteuffel, E. Weber and D. Neumann. 1984. Dictyosome participate in the intracellular pathway of storage proteins in developing *Vicia fava* cotyledones. *Eur. J. Cell Biol.* 34 : 9-17.
- Pernollet, J.C. 1978. Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochem.* 17 : 1473-1480.
- Spencer, D. and T.J.V. Higgins. 1979. Molecular aspects of seed protein biosynthesis. *Curr. Adv. Plant Sci.* 34 : 1-15.
- Sturm, A., T.A. Voelker, E.M. Herman and M.J. Chrispeels. 1988. Correct glycosylation, Golgi-processing and targeting to protein bodies of the vacuolar protein phytohemagglutinin in transgenic tobacco. *Planta* 175 : 170-183.
- Towbin, H., T. Straehlin and T. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350-4354.
- Troncoso, J.C., J.L. March, M. Haner and U. Aebi. 1990. Effect of aluminum and other multivalent cations on neurofilaments *in vitro*: an electron microscopic study. *J. Struct. Biol.* 103 : 2-12.
- Yu, S.C., B.K. Jeong and W.K. Kim. 1988. Studies on the developmental processes of the protein body in the ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) endosperm cell. *Korean J. Electron Microscopy* 18 : 141-152.
- Yu, S.C. and W.K. Kim. 1991. Ultrastructural changes and formation of storage materials in endosperm cells during the seed formation of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Bot.* 34 : 201-213.
- Yu, S.C. and W.K. Kim. 1992. Changes of protein bodies in endosperm cells during embryo development of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) seeds-seeds with red seed coat and indehiscent seeds. *Korean J. Bot.* 35 : 45-51.
- Weber, E. and D. Neumann. 1980. Protein bodies, storage organelles in plant seed. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 175 : 279-306.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 6.** This electron micrograph showed the molecular shape of the purified legumin stained negatively. The legumin molecule seems to have hexagonal structure (diameter; 10 nm) shown on the upper right-hand.
- Fig. 7.** Protein crystal was rarely observed in endosperm cells of mature red seeds. The protein crystal composed of alternating light and dark parallel bands about 4 nm in width. Enlarged micrograph was shown upper left-hand.
- Figs. 8~12.** Electron micrographs showed immunocytochemically stained endosperm cells at the early developing stage.
- Figs. 8, 9, 11.** This electron micrograph showed that legumin was synthesized from the rER at the early developing endosperm cells. Proteins (P) associated with the rER were labelled with gold particles.
- Fig. 10.** ER vesicle (EV) containing legumin was also labelled with gold particles.
- Fig. 12.** This electron micrograph showed that protein containing legumin was transported from cytoplasm to the large central vacuole (CV).
- Figs. 13~16.** Electron micrographs showed immunocytochemically stained endosperm cells at the early developing stage.
- Fig. 13.** Gold particles existed on the distal phase (arrow) and in the vicinity of dictyosomes (D). So this means that legumin moved via the dictyosomes.

- Fig. 14.** Legumin move from the dictyosomes to somewhere.
- Fig. 15.** Gold particles were specifically labelled on the very small protein matrix (arrows) within the small vacuoles (V). Legumin existed in this small vacules.
- Fig. 16.** Proteins containing legumin were in the large central vacuole (CV) near the nucleus (N). Nu; nucleolus.
- Figs. 17~19.** Border line between cytoplasm and vacuoles was not clear during the development of endosperm cells. Numerous proteins (P) scattered locally in the cytoplasm. These numerous small protein lumps were aggregated together step by step, which in turn formed dispassed cluster. N; nucleus.
- Fig. 20.** Electron micrograph showed immunocytochemically stained endosperm cell in the mature red seed. Mature endosperm cells have large spherical protein bodies (PB) containing the legumin scattered evenly. The protein bodies distributed evenly over the cytoplasm. Gold particles did not bind to the globoids (Gb) located in the protein bodies. This means that legumin does not present in the globoids. S; spherosome, N; nucleus.

