

人蔘 種子 胚乳의 Cellulase 局在에 관한 免疫細胞化學的 研究

劉 成 哲 · 金 恩 洙¹ · 金 宇 甲*

高麗大學校 理科大學 生物學科, ¹建國大學校 理科大學 生物學科

채종 후 성숙한 인삼 종자 배유에서 cellulase의 국재를 rabbit anti-cellulase와 protein A-gold를 사용한 면역 세포화학적 방법을 이용하여 확인하였다. Cellulase의 immunogold particle이 전자밀도가 높은 단백질체와 배유 세포벽 주변부에 나타났다. 또한 금입자가 세포벽에 균일하게 분포하였고, 제형층에 집한 분해과정 중의 배유 세포벽을 따라 나타났다. 그러나 세포벽의 섬유성 물질과 배유세포의 분해물질로 구성된 제형층에서는 금입자가 관찰되지 않았다.

주요어: 인삼 배유, 섬유소 가수분해효소, 면역세포화학

식물 종자는 종에 따라 단백질, 지질, 그리고 탄수화물 등의 물질을 저장하는데 성숙기로부터 발아기에 이르는 동안에 배의 지속적인 발달과 더불어 배유내의 저장물질은 점차 분해되는 일련의 양상을 보이며 이는 배유의 퇴화과정에 포함된다. 특히 다양한 가수분해효소의 작용은 배유 또는 자엽의 저장양분, 즉 전분, 다당류(mannan, xyloglucan, galactan), 단백질, 그리고 지질 등이 배로 이동을 용이하게 한다(Higgins *et al.*, 1982; Meier and Reid, 1982; Okamoto *et al.*, 1982; MacGregor *et al.*, 1984; Nielson and Liener, 1984; Torrent *et al.*, 1989). 그렇지만 저장양분의 배로의 이동에 있어서는 비단 이들 저장 물질 뿐만 아니라 배유세포 세포벽의 분해작용이 필연적으로 수반되어야 한다. 전자현미경 수준의 cellulase 활성에 관한 연구는 Bal(1974)에 의해 처음 시도된 이래, 야자 종자(Hasegawa and Smolensky, 1971; DeMason *et al.*, 1989), 토마토 (Pharr and Dickinson, 1973), 양귀비의 유관(Nessler and Mahlberg, 1981), avocado(Dallman *et al.*, 1989), 그리고 대마의 분비선(Kim and Mahlberg, 1994) 등을 대상으로 이루어져 왔다. 조직 혹은 세포내의 특정한 단백질 또는 효소를 선택적으로 확인할 수 있는 방법인 면역세포화학적 방법은 주로 곡류 종자내의 저장단백질에 적용되어 단백질의 종류 및 세포내 분포양상 등에 대해 활발한 연구가 수행되어 왔으나, 종자내에 분포하는 효소의 활성에 대한 면역세포화학적 연구는 목화 종자의 isocitrate lyase(Doman and Trelease, 1985), *Vigna mungo* 유식물 자엽내의 α -amylase(Tomura *et al.*, 1985), jack

bean 종자내의 α -mannosidase(Maycox *et al.*, 1988), 그리고 대추야자 배유의 α -galactosidase(Chandra and DeMason, 1990) 등의 분포양상에 관해 보고된 바 있다. 인삼 종자에서는 Kim(1989)에 의해 종자내 주요 저장단백질에 대한 면역세포 화학적 연구가 수행되었으나, 국내외적으로 성숙한 종자의 배 유세포에 있어서 cellulase의 역할에 관해서는 연구 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구의 목적은 성숙기로부터 발아기에 이르는 동안에 인삼 종자 배유세포내에 저장되어 있는 저장 양분의 가수분해와 함께 가장 활발한 세포벽 가수분해효소인 cellulase 활성을 anti-cellulase antibody에 gold를 붙이는 면역세포화학적 방법으로 이를 확인함으로써 배유세포내 cellulase의 합성 및 활성부위, 배발달 과정에서의 제형층 형성과정과 관련한 cellulase의 작용 등을 밝히는 데 있다.

재료 및 방법

식물재료

강화도에서 재배하는 4년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 홍숙종자를 채종하여 4°C에 보관한 후 재료로 사용하였다.

전자현미경 시료 제작

해부현미경하에서 배를 포함한 배유조직을 채취하여 100 mM phosphate buffered 2% glutaraldehyde(pH 7.2) 용액에서 1시간 전고정한 후, 동일한 완충액으로 세척하고 일부 조직은

*교신저자: Fax (02) 290-1444
© 한국식물학회 [서울] 1994

1% phosphate buffered osmium tetroxide(pH 7.2) 용액에서 1시간 후고정시켰다. 단일고정과 이중고정을 실시한 재료는 ethanol-acetone 탈수과정을 거쳐 Spurr resin(Spurr, 1969)과 LR White resin(Craig and Miller, 1984)에 포매하였다. 포매된 재료는 LKB-V형 ultramicrotome으로 1 μ m 두께의 절편을 제작하여 methylene blue나 toluidine blue로 염색하여 광학 현미경으로 관찰 대상부위를 확인한 다음, 동일한 부위에서 은색절편을 제작하여 nickel grid(200 mesh)에 부착시킨 후, 1% uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(JEOL 100 CX-II, 80 kV)으로 관찰하였다.

면역세포화학적 방법

항체 반응은 Roth 등(1978)과 Craig와 Miller(1984)의 방법을 변형하여 실시하였다. 절편이 부착된 nickel grid를 1% BSA가 포함된 100 mM phosphate buffered saline solution(pH 7.2)에 절편이 아래쪽으로 향하도록 띄운 다음, 항체(anti-cellulase antibody, Dr. P.G. Mahlberg (Indiana Univ.) 제공)와 1:40으로 반응시켰다(4°C, overnight). 반응이 끝난 절편을 PBS-BSA로 세척한 후 20 nm protein A conjugated gold particle(1:20 in PBS-BSA) 용액에 반응시킨 다음, PBS와 증류수로 세척하고 4% uranyl acetate 단일염색 또는 1% lead citrate와 이중염색하여 JEOL 100 CX-II 전자현미경(80 kV)으로 관찰하였다. OsO₄로 후고정한 재료는 10% hydrogen peroxide와 0.56 M sodium metaperiodate로 전처리하였으며, 대조구는 항체와의 반응을 실시하지 않고 이후의 과정은 위의 방법과 동일하게 실행하여 전자현미경으로 관찰하고 항체와 반응시킨 재료와 비교 분석하였다.

결 과

배발달에 따른 성숙 종자의 배유는 다양한 퇴화양상을 나타내었다. 분해중인 구형의 단백질체는 전자밀도가 낮고 치밀하지 않은 단백질기질로 구성되어 있었고, 막을 갖고 있어 전체적인 형태는 상당 기간 유지되었다. 제형층(umbiliform layer)과 인접한 배유 세포벽은 배의 세포벽과 비교하여 상대적으로 두께가 얇아졌다. 발달중인 배는 다수의 구형 액포가 관찰되었으며 배와 배유 사이에 위치한 제형층에는 배유 세포의 분해산물의 유입과 함께 배유세포벽의 분해로 인한 염색상이 낮은 함유물이 확인되었다(Figs. 1-2).

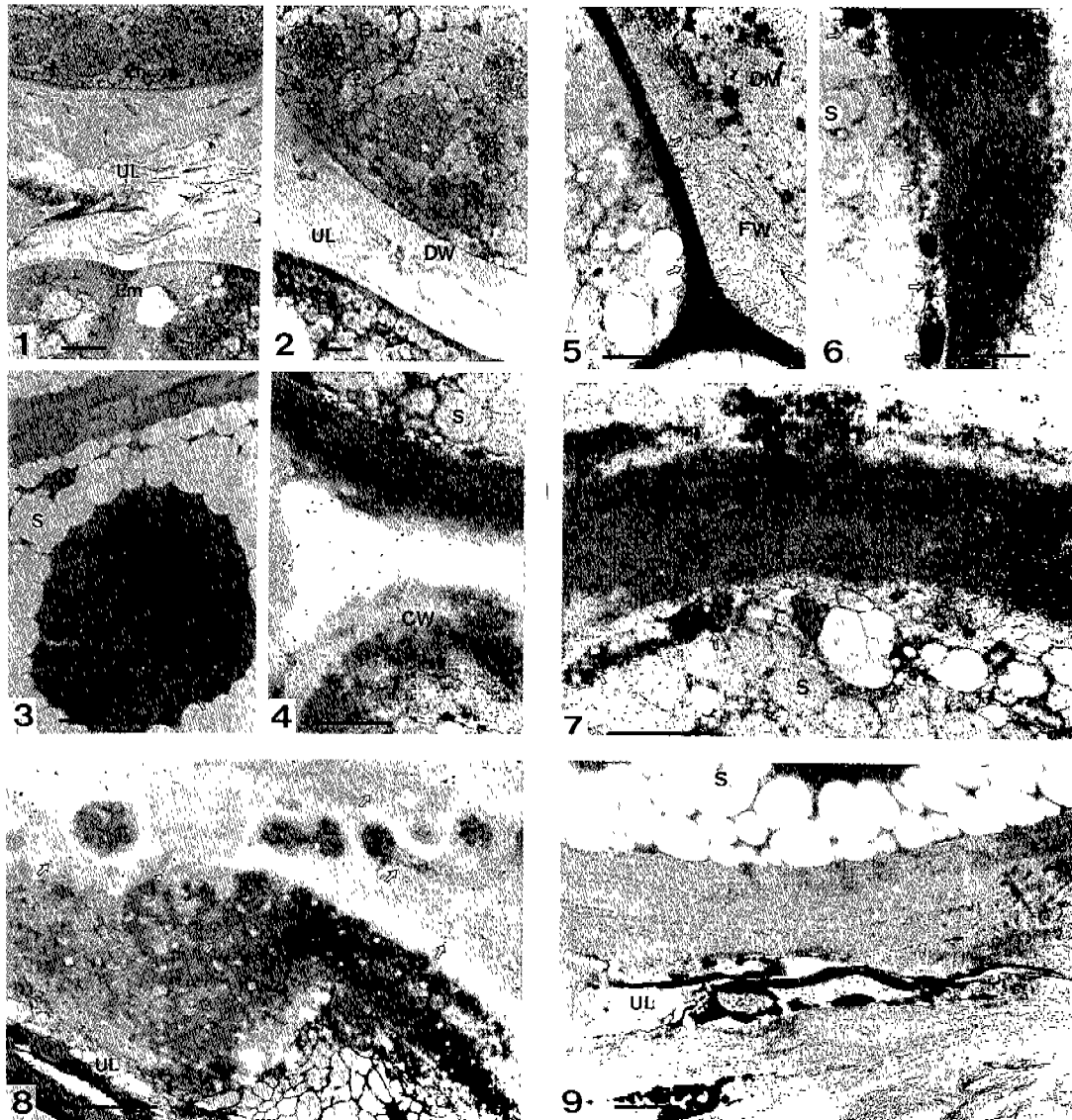
Cellulase에 대한 항체와 반응시킨 후, protein A-gold로 표지시킨 성숙한 인삼 종자에서는 금입자가 배유 세포의 단백질체내 단백질기질과 배유세포벽에 균등하게 분포하였다(Fig. 3). 배유 세포 사이의 세포벽 중심부는 전자밀도가 낮

았으며, 이 부위에 금입자가 산재하여 반응을 나타내었다. 또한 배유세포벽에는 전자밀도가 높은 물질들이 축적되었는데, 이곳도 역시 반응을 나타내었다(Fig. 4). 제형층에는 배유에서 유래한 분해물질과 세포벽의 분해로 인한 다층의 섬유상 구조가 관찰되었으나, 금입자는 분포하지 않았다(Fig. 5). 또한, 금입자는 세포벽과 인접한 전자밀도가 높은 소포에 집중적으로 분포하였고, 세포벽 중심부에 골고루 분포하여 반응을 보였다(Fig. 6). 간혹 스페로솜에 존재하는 비특이성 결합이 소수 관찰되었다(Fig. 6). 전자밀도가 높은 소포에 반응이 일어난 것과는 대조적으로 전자밀도를 갖지 않는 소포의 중심부에는 금입자가 분포하지 않았다(Fig. 7). 제형층과 접한 배유세포의 분해중인 세포벽을 따라 다수의 금입자가 산재하였으나(Fig. 8), 항체와의 반응을 실시하지 않고 protein A-gold complex로 처리한 대조구에서는 단백질체나 세포벽내에서 금입자를 전혀 관찰할 수 없었다(Fig. 9).

고 찰

배발생 과정 동안 배는 배유의 단백질과 탄수화물 혹은 지질 등의 저장물질을 분해, 흡수하여 이용하기 때문에 배유 세포들은 매우 빠르게 가수분해되는데, 배유내의 분해중인 단백질체는 처음 기질단백질이 분해되기 시작하며, 단백질체내에 나타나는 공강은 내부적으로 가수분해가 일어남을 암시한다(Dure, 1975). 단백질체는 분해과정 중에도 형태를 유지하며, 단백질체의 분해와 함께 배유 세포내의 소기관들은 사라지고 결국 배유 세포는 비게 된다(Glennie *et al.*, 1982). 본 연구에서 인삼 종자는 배의 발달에 따라 배유는 다양한 퇴화양상을 보였는데, 분해중인 구형의 단백질체는 막을 갖고 있기 때문에 전체적인 형태는 유지하였으며, 단백질체는 이를 구성하는 단백질기질이 균일하게 분해되고 있었고, 이와 함께 제형층과 접한 배유 세포벽의 폭이 가늘어지는 등 세포벽의 분해양상도 확인되었다. 또한 배와 배유 사이에 위치한 제형층에는 배유 세포의 분해물질의 유입과 함께 배유 세포벽의 분해로 인한 염색상이 낮은 함유물이 확인되었다.

대부분 유배유 종자의 배유 세포에 있어서는 저장물질의 분해와 함께 배유 세포벽은 가수분해효소의 작용을 받아 분해작용이 수반되어야 배의 저장물질 흡수가 원활하게 이루어 지는데, 종자 발아시 가수분해효소중 다수는 단백질체와 관련이 있으며, 적어도 하나의 산성 펩티드 분해효소가 단백질체의 가수분해에 관련이 있다고 하였다(Chrispeels, 1985). Cellulase는 세포의 성장과 분화의 조절작용에 관여하며(Sheldrake, 1970), avocado 과실의 경우 수정 초기에 원형질막과 세포벽에 활성이 나타나 과실의 숙성에도 관여하는 것으로 알려져 왔다(Awad, 1977; Awad and Young, 1979). Cellulase에 대한 항



Figs. 1-2. Electron micrographs of the seed showing embryo (Em), endosperm (En) and umbiliform layer (UL). Bars indicates 1.0 μ m. Digesting endosperm is contrasted with a developing embryo. Protein bodies of the endosperm cells facing the umbiliform layer are different in electron density representing various degraded processes. Umbiliform layer is filled with digested materials including digested cell wall (DW) and storage materials of endosperm cells. Note the thinner endosperm cell wall facing the umbiliform layer.

Figs. 3-9. Immunocytochemical electron micrographs of ginseng seed. Bars indicates 1.0 μ m. Fig. 3. A few gold particles (arrows) are observed in protein matrix within the protein body (PB) and the endosperm cell wall (CW). The spherosome (S) showing absence of immunocytochemical reaction products. Fig. 4. Gold particles are prominent in the intercellular space region of the endosperm cells. S, spherosome. Fig. 5. Umbiliform layer composing of fibrillized wall (FW) and digested material (DM) of the endosperm cell showing little gold particles. Gold particles (arrows) along the endosperm cell wall appeared. Fig. 6. Gold particles (arrows) are very uniformly distributed beneath the wall surface. S, spherosome. Fig. 7. Gold particles (arrows) are present beneath the cell wall surface and the contiguous wall between endosperm cells. CW, cell wall; S, spherosome. Fig. 8. Abundant gold particles (arrows) are shown along the digested cell wall (DW) of the endosperm cell facing the umbiliform layer (UL). Fig. 9. Control showing absence of immunocytochemical reaction product beneath the cell wall (CW) and on the wall of endosperm cells. PB, protein body; S, spherosome; UL, umbiliform layer.

체와 반응시킨 후, protein A-gold로 표지시킨 인삼 종자의 절편조직에서 배유의 퇴화가 시작되기 이전에는 소량의 금입자가 배유 세포의 단백질체내 단백질기질과 배유 세포벽에 골고루 분포하였다. 또한 배유 세포벽과 인접하여 전자밀도가 높은 소포들에 반응이 나타난 것으로 보아 배유 세포내의 저장물질의 분해시기 이전에는 미약한 반응을 보이며 저장물질의 분해와 이동에 따라 세포벽쪽으로 이동되어 활성을 나타냄이 확인되었다.

Chandra와 DeMason(1990)은 대추야자 배유의 α -galactosidase에 대한 면역세포화학적 연구에서 금입자가 배유 세포내 단백질체와 내측 세포벽에 나타났으며, 배유의 분해 동안에 각기 다른 단계의 원형질체와 세포벽의 붕괴가 일어났다고 보고하였다. 또한 세포질의 완전한 용해로 인해 형성된 세포강 내측 세포벽에서 다수의 금입자를 관찰하였다. Maycox 등(1988)은 α -D-mannosidase가 종자 형성시기 동안 단백질체내에 나타난다고 하였다. Verma 등(1975)과 Awad(1977)는 수확 후 과실의 숙성시기에 cellulase의 양이 급격히 증가하는데, 이 효소는 막성 폴리솜에 의해 합성되고, 주로 원형질막과 세포벽 사이에 축적되며 반응산물은 세포벽이 퇴화되는 위치에 축적된다고 하였다. Bennett와 Christofferson(1986)은 cellulase가 거대분자량의 펩티드 전구물질로서 합성되며 단백질 형태로 분비되어 막과 관련이 있다고 하였다. 또한 종자의 발아에 따른 세포벽의 분해양상이 배유 세포에서 나타난다고 하였다(Jacobsen et al., 1979). 인삼 종자의 제형층에는 배유에서 유래한 분해물질과 세포벽의 분해로 인한 다층의 섬유상 구조가 관찰되었으나, 반응을 보이지 않아 저장물질과 세포벽의 분해가 끝난 곳에서는 반응이 나타나지 않음이 확인되었다. 금입자는 세포벽과 인접한 전자밀도가 높은 소포에 집중적으로 분포하였고 세포벽 중심부에 골고루 반응을 나타냈으며 원형질막과 세포벽에서 활성을 보인 cellulase가 성숙시기 동안 그 양이 증가하여 다량의 반응산물을 세포벽에 축적시키는 것이 확인되었다. 또한 전자밀도가 높은 소포에 반응이 일어난 것과는 대조적으로 전자밀도를 갖지 않는 소포의 중심부에는 금입자가 분포하지 않은 것으로 보아 cellulase가 배유 세포내 저장물질의 가수분해에 의한 배로의 물질 이동과정에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 제형층과 접한 배유 세포의 분해중인 세포벽을 따라 다수의 금입자가 산재하였으나, 항체와의 반응을 실시하지 않고 protein A-gold complex로 처리한 대조구에서는 단백질체나 세포벽내에서 금입자를 전혀 확인할 수 없었다.

결론적으로, 인삼 종자의 성숙기로부터 발아기에 이르는 동안에 배유 세포내에서 생성되어 활성을 보인 cellulase는 다른 가수분해효소의 작용으로 분해된 저장물질이 제형층과 접한 세포벽쪽으로 이동되는 시기에 세포벽의 변성을 유도하

였고, 결국 세포벽의 분해를 초래하여 저장물질의 배로의 이동에 관여하는 것으로 판단되었다.

인 용 문 헌

- Awad, M. 1977. Variation in cellulase content of Fuerte avocado fruit after harvest. *HortScience* **12**: 406.
- Awad, M. and R.E. Young. 1979. Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana*) fruit in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* **64**: 306-308.
- Bal, A. 1974. Cellulase. In *Electron Microscopy of Enzyme*. Vol. 3. M. Hayat (ed.). Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 68-79.
- Bennett, A.B. and R.E. Christofferson. 1986. Synthesis and processing of cellulase from ripening avocado fruit. *Plant Physiol.* **81**: 830-835.
- Chandra, K.N. and D.A. DeMason. 1990. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* **181**: 53-61.
- Chrispeels, M.J. 1985. Immunocytochemical localization of phaseolin and phytohemagglutinin in the ER and Golgi complex of developing bean cotyledons. *Planta* **164**: 295-302.
- 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. Rep.* **8**: 879-886.
- Dallman, T.F., W.W. Thomson, I.L. Eaks and E.A. Northgal. 1989. Expression and transport of cellulase in avocado mesocarp during ripening. *Protoplasma* **151**: 33-46.
- DeMason, D.A., K.N. Chandra and M. Harris. 1989. Endosperm development in the date palm (*Phoenix dactylifera*) Arecaceae. *Am. J. Bot.* **76**: 1255-1265.
- Doman, D.C. and R.N. Trelease. 1985. Protein A-gold immunocytochemistry of isocitrate lyase in cotton seeds. *Protoplasma* **124**: 157-167.
- Dure, L.S. 1975. Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**: 259-278.
- Glennie, C.W., J. Harris and V.D.W. Liebenberg. 1982. Endosperm modification in germinating sorghum grain. *Cereal Chem.* **60**: 27-31.
- Hasegawa, S. and D.C. Smolensky. 1971. Cellulase in dates and its role in fruit softening. *J. Food Sci.* **33**: 588-591.
- Higgins, T.J.V., J.V. Jacobsen and J.A. Zwar. 1982. Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* **1**: 191-215.
- Jacobsen, J.V., T.J.V. Higgins and J.A. Awar. 1979. Hormonal control of endosperm function during germination. In *The Plant Seed*. I. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach (eds.). Academic Press, London, pp. 241-262.
- Kim, E.S. and P.G. Mahlberg. 1994. Cytochemical localiza-

- tion of cellulase activity associated with secretory cavity formation in glands of *Cannabis*. *Protoplasma* (submitted).
- Kim, W.K. 1989. An immunocytochemical study on storage proteins of ginseng seed. *Korean J. Electron Microscopy* **19**: 74-84.
- MacGregor, A.W., F.H. MacDougall, C. Mayer and J. Dausant. 1984. Changes in levels of α -amylase components in barley tissues during germination and early seedling growth. *Plant Physiol.* **75**: 203-206.
- Maycox, P.R., J. Burgess, S.E. Marcus and D.J. Bowles. 1988. Studies on α -D-mannosidase and Con-A during jack bean development and germination. *Protoplasma* **144**: 34-45.
- Meier, H. and J.S.G. Reid. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 13A. F.A. Loewus and W. Tanner (eds.). Plant Carbohydrates. Springer-Verlag, Berlin, New York, pp. 418-471.
- Nessler, C.L. and P.G. Mahlberg. 1981. Cytochemical localization of cellulase activity in articulated, anastomosing laticifers of *Papaver somniferum*. *Am. J. Bot.* **68**: 730-732.
- Nielsen, S.S. and I.E. Liener. 1984. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* **74**: 494-498.
- Okamoto, K., T. Murai, G. Eguchi, M. Okamoto and T. Kazawa. 1982. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. II. Ultrastructural changes in scutellar epithelium. *Plant Physiol.* **70**: 905-911.
- Pharr, D.M. and D.B. Dickinson. 1973. Partial characterization of Cx cellulase and cellobiose from ripening tomato fruits. *Plant Physiol.* **51**: 577-583.
- Roth, J., M. Bendayan and L. Orci. 1978. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J. Histochem. Cytochem.* **26**: 1074-1081.
- Sheldrake, A.R. 1970. Cellulase and cell differentiation in *Acer pseudoplatanus*. *Planta* **95**: 167-178.
- Spurr, A. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-34.
- Tomura, H., T. Koshiba and T. Minamikawa. 1985. Immunohistochemical localization of α -amylase in cotyledons of *Vigna mungo* seedlings. *Plant Physiol.* **79**: 935-938.
- Torrent, M., I. Geli and M.D. Ludevid. 1989. Storage-protein hydrolysis and protein-body breakdown in germinated *Zea mays* L. seeds. *Planta* **180**: 90-95.
- Verma, D.P.S., G.A. Maclachlan, H. Byrne and D. Ewings. 1975. Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls. *J. Biol. Chem.* **250**: 1019-1026.

(1994. 8. 24 接受)

Immunocytochemical Localization of Cellulase on Endosperm of Ginseng Seed

Yu, Seong Cheol, Eun Soo Kim¹ and Woo Kap Kim*

Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea; and

¹*Department of Biology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea*

ABSTRACT

This study has been carried out to investigate the localization of the cellulase activity using anti-cellulase antibody against rabbit as a marker on the endosperm cells of *Panax ginseng* C.A. Meyer with immunocytochemical techniques. Immunogold detection of cellulase revealed labelling associated with the electron dense protein bodies and the peripheral region of the endosperm cell. Gold particles are very uniformly distributed beneath the wall surface, and along the digested cell wall of the endosperm cell facing the umbiliform layer. However, umbiliform layer which was composed of fibrillized wall and digested material of the endosperm cell showed little gold particles.

Keywords : *Panax ginseng* endosperm, cellulase, immunocytochemistry

*Corresponding author: Fax +82-2-920-1444