

## HVEM에 의한 색소체내 초미세구조의 3차원적 분석 Three Dimensional Analysis of Plastid Inclusion Body Using HVEM

김인선

계명대학교 자연과학대학 생물학과

### 1. 서론

세포의 미세구조 연구에서 HVEM의 이용과 tomography에 의한 image 처리는 생체시료의 초미세 세포구조 등의 연구에 큰 발전을 이루고 있으며, 이러한 기술은 세포의 3차원적 분석에서 핵심적인 역할을 하고 있다. 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. 색소체(plastid)는 식물세포에 발달하는 매우 중요한 세포소기관으로 광합성뿐만 아니라 여러 가지 대사과정을 동시에 수행하는 기능적으로 복잡한 구조이다.

내막으로 둘러싸인 색소체내 액체성 구획은 기질로서 광합성의 암반응인 캘빈회로가 일어나는 중심부이다. 특히 CAM 대사를 수행하는 일부 종에서는 성장단계상 또는 일주기성(diurnal fluctuation) 현상으로 색소체 기질에 결정상의 구조를 형성하는데 이들에 대한 연구는 자세히 이루어지지 않고 있다. 그러나 구조적으로 변하는 CAM 식물 엽육조직 내 색소체 기질상의 결정구조의 변이현상을 밝히려는 노력은 시도된 바 있다. 이들 결정체는 단백질성 전구물질로 된 구조로서 일부 식물이 제한된 조건에 적응하여 CAM 대사를 수행할 때 필요한 효소를 저장하여 공급해 주는 부위라고 추정되고 있다. 이와 같이 일부 C-4 또는 CAM 식물들은 수분조건에 따른 적응현상으로 성장단계에 따라 색소체 분화를 보이는 등 세포수준에서 결정체 형성과 같은 미세구조적 분화를 유도시킬 수 있다. 여러 CAM 식물에서 이러한 결정체들이 형성되나, 이들이 색소체 내에서 발달할 때 틸라코이드나 색소체 내막 또는 인접하고 있는 녹말입자 등과의 입체 구조적 특성에 대하여는 자세히 연구된 바 없다.

광학현미경 및 저배율의 TEM을 이용한 색소체 구조 연구에서는 이들의 분포 및 위치 등은 확인할 수 있으나, 이들 결정체들이 접하고 있는 색소체내 여러 막성계 및 녹말입자 등과의 공간적 정보 (spatial relation)에 대해서는 배율이 비교적 높은 TEM을 이용하여도 자세히 알아낼 수 없다. 이에 반해 CAM 대사 수행시 성장 발달에 따라 엽육 세포 색소체 기질에 일시적으로 커다란 결정상의 구조를 발달시키는 *Sedum rotundifolium*를 HVEM으로 연구 tilting을 실시하면 angle에 따라 상이한 image들이 나타

나는 것을 확인할 수 있다. 이들의 tilting 이미지를 stereo viewer를 통하여 관찰하면 결정구조에 인접한 막성계 및 기질과 인접하는 다른 미세소기관들 간의 보다 입체적인 정보를 얻을 수 있음에 착안하여, 본 연구는 tilted image와 연속 초박절편(serial ultra-thin sections), semi-thick serial sections, 후박절편 (serial thick section)을 이용한 HVEM 연구에 중점을 두었다. TEM 및 HVEM으로 관찰하여 얻은 이들 연속절편들의 2-D image를 3차원 입체구조로 재구성함으로써 CAM 대사를 수행하는 색소체내 결정체를 구성하는 초미세구조의 특성을 규명하고자 하였다.

## 2. 실험 방법

High pressure freezing (HPF) 방법으로 고정된 시료는 freeze substitution system 장치에 의한 프로그램에 의하여 substitution → embedding → polymerization의 과정을 거쳐 resin block으로 제작되었다. HPF의 급속동결기법은 현재까지 생물시료를 고정하여 artifact를 최소화하는 가장 효과적인 방법으로 그 방법은 다음과 같다. *Sedum rotundifolium*의 미분화 및 성숙 발달한 엽육조직 시료를 채취하여 30% dextran (non-penetrating cryoprotectant, 178,000 MW, Sigma) 용액의 aluminum cavity에 넣고 이를 1% (in pure chloroform) lecitin으로 coating한 또 다른 cavity로 덮은 후 specimen holder에 넣어 high pressure freezer로 cryo-fixation 하였다. HPF 실시 후 신속하게 cavity를 액체질소(LN)에 옮겨 freezing substitution을 수행하였다. Freeze substitution은  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 2% osmium tetroxide( $\text{OsO}_4$  in 100% acetone)를 각각 8시간씩 처리한 후 무수 acetone으로 washing하였다. 이 후 Epon 812 mixture로 embedding 하여 72시간동안 중합 ( $60^{\circ}\text{C}$  polymerization) 처리하였다. HPF 방법과 함께 2-4% glutaldehyde 및 1% aqueous osmium tetroxide을 이용한 화학고정에 의한 전자현미경적 시료 제작법이 병행되어 고정 방법에 따른 일부 세포내 초미세구조의 변화를 조사하였다.

*Sedum rotundifolium*의 EM block은 초박절편(60-90 nm)과 후박절편(0.25-0.5  $\mu\text{m}$ )으로 제작되어 uranyl acetate(1 hr,  $60^{\circ}\text{C}$ ) 및 lead citrate (1 hr, RT)염색 또는 *en bloc* (4-6 hr) 염색되었다. Formvar coating 처리한 single hole grid에 1-2회 carbon coating하여 TEM 및 HVEM으로 연속절편(serial section)에 의한 2-D 영상과 tilting image 결과를 수집하였다. 이들을 일정한 각도( $\pm 2^{\circ}$ )로 tilting하여 얻은 이미지를 stereo viewer를 통하여 관찰하면 결정구조에 인접한 막성계 및 기질과 인접하는 다른 미세소기관 사이의 보다 입체적인 정보를 얻을 수 있음에 착안하여, 본 연구는 tilted image( $\pm 60^{\circ}$ )와 연속 초박절편(serial ultra-thin sections), semi-thick serial sections, 후박절편 (serial thick section)을 이용한 HVEM 연구에 중점을 두었다. 먼저 TEM 및 HVEM에 의한 이들 연속절편의 2-D image를 3-D image화 하고자 디지털화한 image의 3차원 영상 재구현에 필수적인 IMOD (Image Processing, Modelling and Display) 프로그램을 적용하였고, 결정구조를 구성하는

요소들 간의 규칙성을 밝히기 위하여 이들 초미세 구조에 대하여 diffraction pattern을 실시하였다. 즉, 색소체내 결정구조들에 대하여 tilting에 의한 HVEM 전자현미경으로부터 얻어진 data 및 tomography 기법을 이용한 중점적인 image 처리과정을 거쳐 초미세 세포영상의 구조 정보를 추출하여 세포수준에서의 3-D 입체구조를 재구성하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

*Sedum rotundifolium* 미분화 및 분화 엽육조직을 60-90 nm 초박절편, 100-125 nm semi-thick sections, 0.5-1  $\mu\text{m}$ 의 후박절편에 이르기까지 각각 연속절편을 제작하여 색소체를 이루는 결정체 구조를 조사하였다. 약 0.1 mm 내외의 경엽부 정단 부위가 빛에 노출되기 전 엽육조직 분화초기 단계에 이미 분열조직세포 색소체 내에는 1  $\mu\text{m}$  내외의 작은 크기에서부터 6-7  $\mu\text{m}$  크기에 이르는 결정체들이 형성되어 색소체 용적의 큰 부분을 차지하는 초미세구조로 발달하였다. 색소체 기질에 분산되어 3-4개의 결정구조로 발달하는 것으로 조사되었으나 연속절편에 의한 연구에 의하면 이들은 실제로 하나의 커다란 결정체가 국부적으로 분리되거나 끝 부위 등이 분지하여 여러 개로 발달하는 것처럼 2-D image 상에 나타난 것이다. 이들 초미세구조들은 시료 제작시 section angle에 따라 또는 UHVEM 상에서 일정한 각도로 tilting 함에 따라 상이한 image의 구조들로 관찰되었다. 이들을 일정한 각도 ( $\pm 2^\circ$ ,  $\pm 5^\circ$ )로 tilting하여 얻은 이미지에서는 동일 결정체내에서도 구성요소들이 격자구조(crystalline lattice)를 이루거나 평행구조(paralleled arrangements)를 형성하였다(Fig. 2). 이들 결정체 내에는 약 17.9-18.6 nm 격자거리로 이루어진 수백-10,000개 이상의 미세소관성 요소들(tubular elements)이 형성되며, 이들은 규칙적으로 배열되어 다시 6개의 substructure들이 육방정계(hexagonal pattern, diffraction pattern 참조)를 이루는 정교한 구조가 되었다. 색소체 내에는 이러한 결정체가 하나 이상 발달하는 경우도 흔히 관찰되었고, 연속 절편 연구 및 3-D 입체구조 재구현 분석에 의하면 여러 개로 분리되어 형성되어 있는 결정체들이 융합하여 거대한 결정체를 이루기도 하였다. 이들 미세소관성 요소들은 막으로 둘러싸이지 않으며 일정한 형태를 이루지 않는 무정형(amorphous)의 구조를 이룬다. 특히, 전색소체 단계의 색소체에서는 전판상체와 녹말입자와 연관되어 발달하며, 엽육이 성숙 발달하여 엽록체 단계에 이르면 결정체를 비롯한 녹말입자, 전판상체는 엽육세포에서 완전히 사라지고 틸라코이드와 지질 입자가 발달한다. 표피세포 내 결정체는 거의 대부분 녹말입자와 연계되어 발달하였으나 결정체 구성 요소들의 격자간 거리는 엽육세포의 경우와는 달리 나타났다. 이들이 엽육세포 색소체에서와 같이 미세소관성 요소로 구성되어 있는지 또는 인접하고 있는 틸라코이드 막성계로부터 기원하는지를 알아내기 위하여 표피세포 색소체에 대한 HVEM 연구가 계속 진행되고 있다.

#### 4. 참고문헌

- Giddings, TH (2003) Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples. *J Microsc* 212, 53-61.
- Gilbert PFC (1992) Reconstruction of a 3-dimensional structures from projections and its application to electron microscopy II. Direct methods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 182: 89-102.
- Gilky JC, Staehelin LA (1986) Advances in ultra-rapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. *J Electron Microsc Tech* 3: 177-210.
- Haseloff J (2003) Old botanical techniques for new microscopes. *Biotechniques* 34: 1174-1182.
- Kim I (1997) Chloroplast microtules in young leaves of *Sedum rotundifolium*. *J Plant Biol* 40:115-119.
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR (1996) Computer visualization of the three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116: 71-76.
- 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.

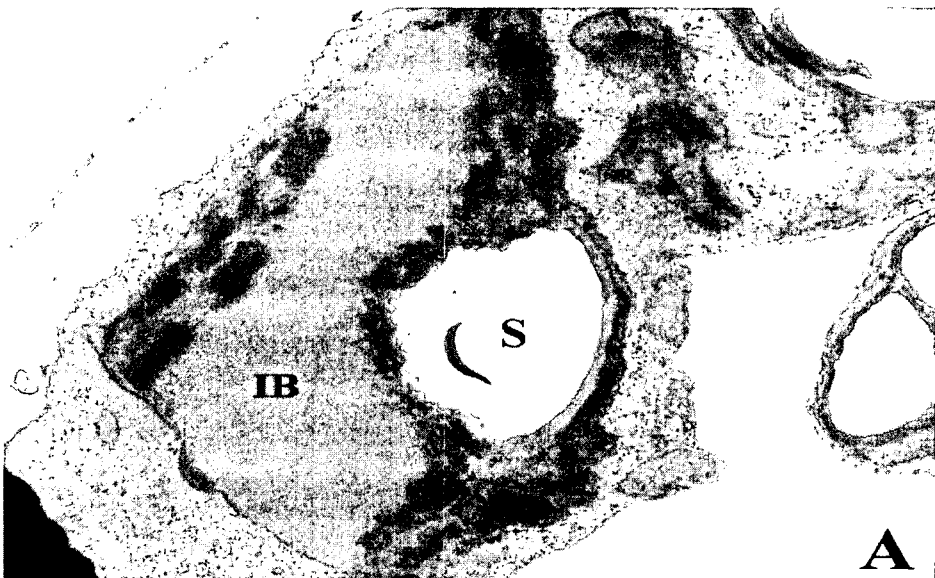


Fig. 1. *Sedum rotundifolium* 엽육조직 세포 색소체 내 커다란 결정체 (IB = Inclusion Body, S = starch). 저배율 투과전자현미경 사진.

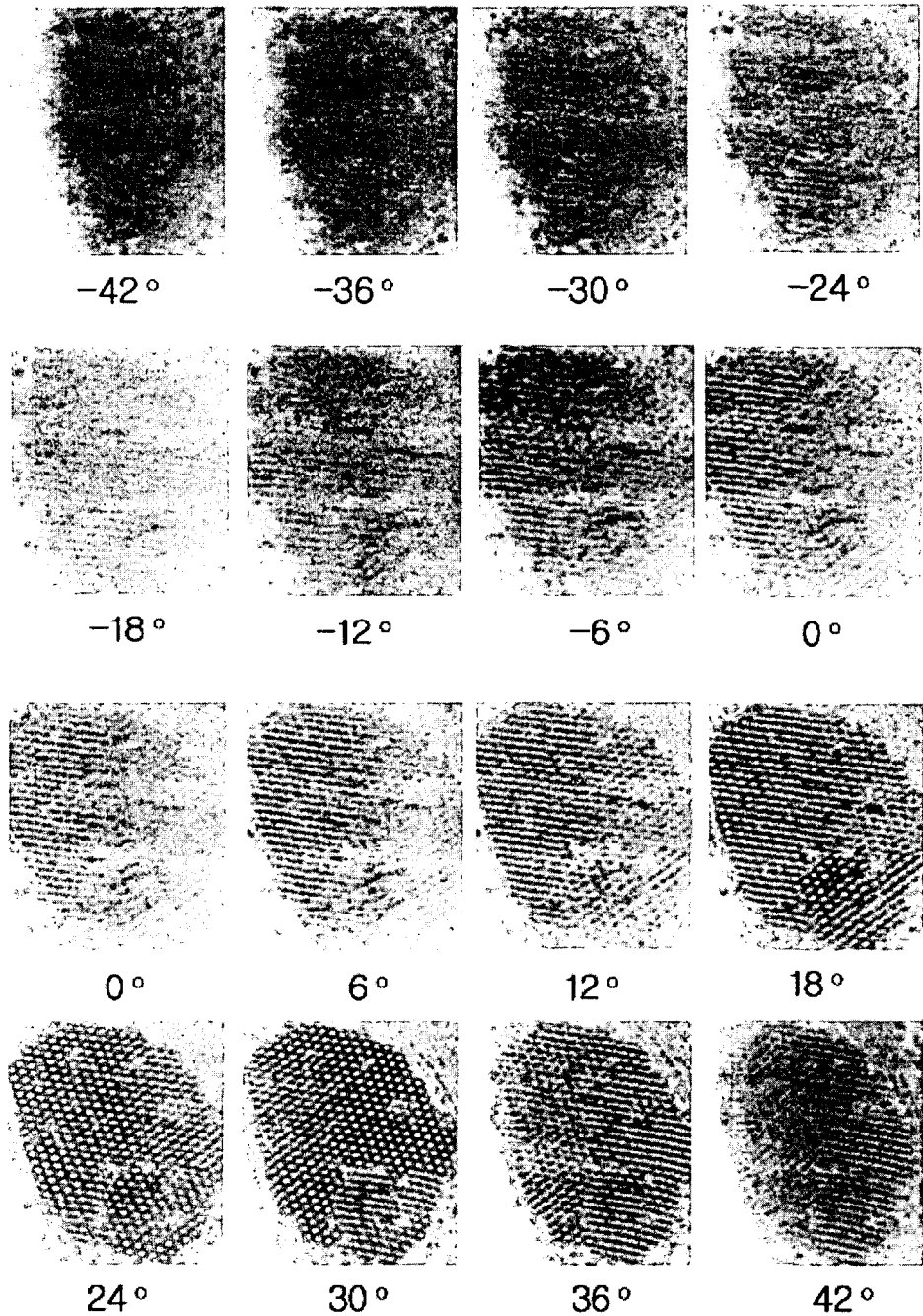


Fig. 2.  $6^\circ$  간격,  $\pm 42^\circ$  tilting에 의한 결정체 내 미세소관성 구성요소들의 다양한 배열양상

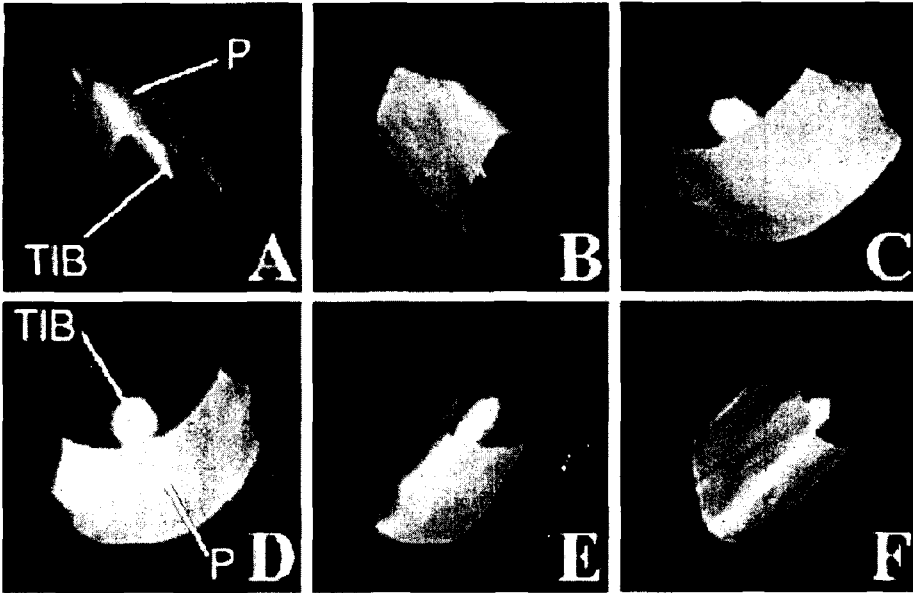


Fig. 3. 엽육세포 색소체 결정체의 3-D 입체구조.

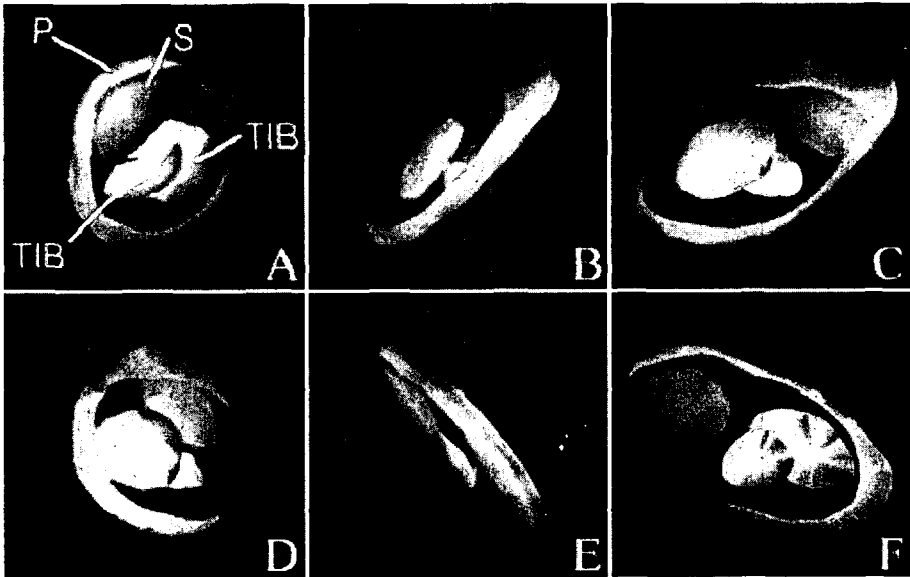


Fig. 4. 표피세포 색소체 결정체 3-D 입체구조 TIB = tubular inclusion body (light blue), P = plastid (green), S = starch (pink)