

Chlorella 의 磷酸代謝에 관한 研究¹⁾

李 永 祿

(高麗大學校 · 理工大學 · 生物學科)

Studies on the Phosphate Metabolism in Chlorella, with Special Reference to Polyphosphate.

Lee, Yung Nok

(Department of Biology, Korea University)

(1964. 8. 4 受理)

ABSTRACT

Yung Nok Lee (Dept. of Biology, Korea University) : Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella*, with special reference to polyphosphate. Kor. J. Microbiol., Vol. 2, No. 1, p 1~11 (1964).

1. Uniformly ³²P-labeled *Chlorella* cells which were irradiated with Cobalt-60 gamma-rays of about 70,000 r dose, were further grown in a standard "cold" medium ("hot" → "cold"), and some portions of the algae were taken out at the beginning of, and at intervals during the culture, and subjected to analyze the contents of ³²P and total P in various fractions of the cell materials. Results obtained were compared with those of nonirradiated normal cells.

2. Amounts of phosphate in various fractions of the nonirradiated normal *Chlorella* cells were measured using uniformly ³²P-labeled cells. Analysis of the ³²P-labeled algal cells showed that the highest value in P-content was the fraction of RNA followed by those of lipid, polyphosphate "C" polyphosphate "B", DNA, nucleotidic labile phosphate compounds, polyphosphate "A" and protein. It was observed that content of total polyphosphates in a single *Chlorella* cell was almost equal to RNA-P content in the cell, and the amount of RNA-P was almost equal to ten times of DNA-P content.

3. When the ³²P-labeled algae which were irradiated with gamma-rays were grown in a normal "cold" medium, phosphate contents in the fraction of DNA, nucleotidic labile phosphate compounds and protein decreased markedly, while the contents of phosphate in the fractions of polyphosphate "C" and polyphosphate "B" increased in comparison with those of unirradiated normal cells. So, it was considered that the pretreatment of above mentioned dose of gamma-ray inhibited DNA and protein synthesis from polyphosphate in *Chlorella* cells.

4. Proceeding the culture of ³²P-labeled *Chlorella* in a "cold" standard medium, whose synthetic activity of DNA and protein from polyphosphate was disturbed by gamma-ray irradiation, the amounts of ³²P in the fraction of polyphosphate "C" increased, in contrast with those of polyphosphate "B" fraction. According to these experimental results, it was inferred that polyphosphate "B" could transform into polyphosphate "C" in normal growing *Chlorella* cells.

1). 略字. RNA, ribonucleic acid; DNA, deoxyribonucleic acid; PCA, perchloric acid; TCA, trichloroacetic acid; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; Pi, inorganic orthophosphate; $\Delta 10 P$, amount of orthophosphate liberated by hydrolysis with IN H₂SO₄ for min. at 100°C.

緒 論

*Chlorella*의 磷酸代謝에 미치는 γ -線의 作用을 究明코져 ^{32}P -phosphate로 均等히 label한 *Chlorella*를 使用하여 *Chlorella* 細胞內의 여러가지 磷酸化合物의 含量을 測定하고, cobalt-60 γ -線으로 照射한 *Chlorella*의 照射後 培養過程을 통한 細胞內의 lipid, acid soluble nucleotide, DNA, RNA, Poly-P 및 Protein fraction 등에 있어서의 磷酸含量의 變化를 調査하여 對照區의 그것과 比較한 結果 *Chlorella*의 磷酸代謝에 關하여 새로운 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

本研究는 著者가 國際原子力機構研究員으로 日本 東京大學 應用微生物研究所에서 行한 것이다. 이를 추선하여 韓國原子力院과 國際原子力機構의 關係人事 및 高麗大學當局에 感謝의 뜻을 表하며 아울러 本研究에 諸般의 便宜를 제공하여 주고 指導鞭撻하여 주신 李敏載 教授와 東京大學 應用

微生物 研究所의 田宮 博, 長谷榮二 兩教授 및 富地重遠 博士께 甚深한 謝意를 表한다.

材料 및 方法

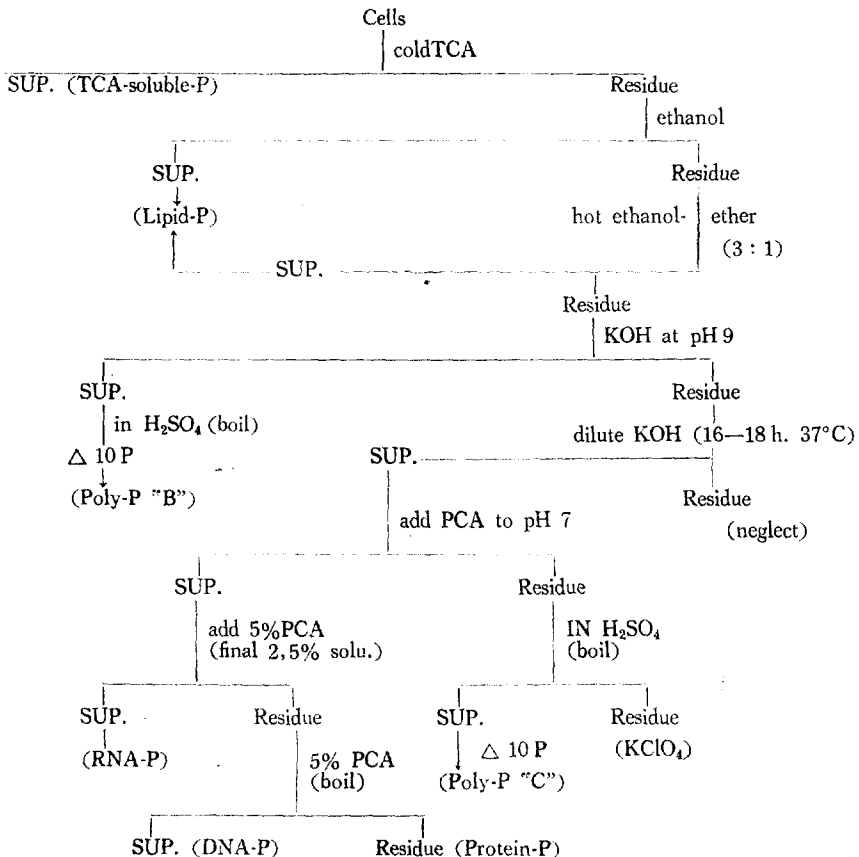
*Chlorella*의 ^{32}P -labeling

*Chlorella ellipsoidea*를 0.5 mc의 ^{32}P -phosphate를 包含하는 無機培地에 接種하여 25°C에서 4, 5日間 培養하였다. 培地의 組成은 l當 5.0g KNO_3 , 2.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.25g KH_2PO_4 , 0.003g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 1 ml.의 ARNON'S A₅ 溶液⁽²⁾을 含有하고 培養期間中 계속하여 CO_2 -enriched air로 bubbling시키고 約 7,500 lux의 照明을 維持하였다. 細胞의 質量이 接種時의 約 10倍에 達하였을 時 細胞를 收穫하여 0.002 M의 K_2SO_4 溶液으로 두번 씻은 후 cobalt-60 γ -線으로 照射하였다.

갠마線의 照射

γ -線의 照射는 cobalt-60 γ -ray irradiator 內에서 室溫에서 行하였으며 照射時의 細胞密度는 1 ml.의

Table I. Fractionation of Phosphate Compounds in *Chlorella*



cell suspension 當 packed cell volume 0.38 ml. 이었다. 線量의 強度는 420 r/min. 로 세 時間에 걸쳐 約 70,000 r 이 照射되었다. 비슷한 實驗條件下에서 約 70,000 r 으로 照射된 *Chlorella* 細胞의 生理的 機能은 照射直後 光合成能이 約 9%의 減少를 보이고 呼吸能이 約 5%의 減少를 보인다.⁽¹⁸⁾

磷酸化合物的 分劃操作

γ -線에 照射된 細胞는 正常的인 "Cold" medium 에 接種하여 培養하였다. 接種時와 培養의 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 表 I 과 같은 手順으로 細胞를 分劃하였다. 核酸의 分離는 Schmidt and Thannhauser 法⁽²⁴⁾에 依據하였고 Polyphosphate 의 分離는 Miyachi and Tamiya 法⁽²¹⁾을 多少 改良하였는데 細胞의 處理順序는 다음과 같다.

(I) 8%의 cold TCA (또는 5% PCA)로 2회 (30分間 및 15分間), (II) 95% 및 75% ethanol 로 각각 1회, (III) hot ethanol-eter (3:1)로 3회乃至 4회, (IV) cold (dilute) KOH 로 pH 9로 하여 2회(1時間 및 30分間) 抽出한 후 (V) dil KOH 로 37°C 에서 16~18時間 處理하여 沈澱物을 除去하고 (VI) 上澄液을 PCA 로 中和하여 Poly-P 를 共沈시키고, (VII) 上澄液에 5% PCA 를 加하여 2.5% 溶液이 되게하여 (VIII) 沈澱된 DNA 蛋白質은 5% PCA 에 懸濁하여 15分間 100°C 에서 加熱하여 蛋白質을 沈澱시킨다.

分析

各 fraction 의 ³²P 의 量은 그들의 放射能을 測定하여 培養液의 ³²P 의 比放射能으로부터 算出하거나 放射能을 그대로 表示하였고 total-P 의 量은 各 fraction 의 磷酸化合物을 Kjeldal flask 內에서 H₂SO₄ 로 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske and Subbarow 法⁽⁹⁾으로 測定하였다.

Orthophosphate: Berenblum and Chain 法⁽³⁾에 따라 操作 I 에서 얻은 上澄液에 H₂SO₄ (最終濃度: 0.1 N)와 ammonium molybdate(最終濃度: 0.0016 M) 및 isobutanol 3 ml. 를 加하여 세게 흔든 다음 isobutanol 層을 取하여 그 放射能을 測定하였다.

Nucleotidic labile phosphate: Crane and Lipman 法⁽⁶⁾에 따라 操作 I 에서 얻은 上澄液에 charcoal (Norit SX-30)을 加하여 잘 흔들어서 0°C 에서 30分間 吸着시킨 다음 遠心分離로 charcoal 을 分離하고 H₂SO₄ (最終濃度: IN)을 加하여 100°C 에서 10分間 處理하였다. 冷却시킨 후 標品에 ammonium molybdate (最終濃度: 0.016 M)와 isobutanol 을 加하여 isobutanol 層의 放射能과 phosphomolybdate 의

量을 測定하였다.

Sugar phosphate: 操作 I 에서 얻은 上澄液으로부터 orthophosphate, nucleotidic labile phosphate 및 acid soluble polyphosphate 의 量을 각각 測定하고 acid soluble fraction 의 total phosphate 에서 그들의 값을 除한 値를 sugar phosphate 로 推定하였다.

Polyphosphates: Miyachi and Tamiya 法⁽²¹⁾에 따라 *Chlorella* 細胞에 存在하는 세 가지 종류의 相異한 polyphosphate 를 다음과 같이 定量하였다.

Polyphosphate "A"(酸可溶性). 操作 I 에서 얻은 上澄液에 少量(3%)의 metaphosphate 를 carrier 로 加하고 pH 를 4.0 로 조절한 후 acetate buffer 및 稀한 Ba(NO₃)₂ 溶液을 加하여 잘 흔들어서 5°C 에 하루 밤을 維持하고 形成된 沈澱物을 遠心分離하여 IN HCl 에 溶解시킨 다음 그 放射能을 測定하였다.

Polyphosphate "B"(酸, 不溶性, pH 8~10 可溶性). 操作 IV 에서 얻은 上澄液에 H₂SO₄ (最終濃度: IN)를 加하여 10分間 沸騰시켜 加水分解된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

Polyphosphate "C"(酸 및 pH 8~10 不溶性 37°C 에서 alkali (2 N~3 N KOH)에 16~18時間 處理로 溶출된다.). 操作 VI 에서 얻은 沈澱物을 IN H₂SO₄ 으로 10分間 沸騰시켜 얻은 溶液은 多量의 orthophosphate 를 包含하고 있으나 다른 有機磷酸이나 索外部에 吸收되는 物質은 거의 없다. 따라서 이 沈澱物을 10分間 끓는 H₂SO₄ 용액속에서 加水分解시켜 얻은 無機磷酸의 量을 測定하였다.

Phospholipid: 操作 II 및 III 에서 얻은 上澄液을 혼합한 것을 lipid fraction 으로 보고 그 少量을 取하여 semimicro Kjeldal flask 內에서 H₂SO₄ 로 加水分解시켜 얻은 orthophosphate 의 量을 測定하였다.

RNA-P 및 DNA-P: 操作 VII 및 VIII 에서 얻은 上澄液을 각각 RNA 및 DNA fraction 으로 보고 그들의 磷酸含量을 測定하였다. 또한 이들의 索外部 吸收度를 Cary 의 spectrophotometer 로 測定하여 그 値를 比較하였다.

Protein-P: 操作 VII 에서 얻은 沈澱物을 2% KOH 에 溶解시킨 후 Semimicro Kjeldal flask 內에서 酸으로 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

實驗結果

Chlorella 細胞의 各種 磷酸化合物 含量

특히 DNA 및 RNA fraction 의 從來의 測定值⁽¹³⁾

(14) (21) 에 관한 差異가 있었으므로 *Chlorella* 細胞의 各種磷酸化合物 含量을 보다 正確히 測定코져 分割手續中 (V) alkali 處理를 각각 다른 濃度에서 行하고 그 結果를 比較하여 보았다. 여러가지 標品에서 測定한 ^{32}P 로 均一히 label 된 *Chlorella* 細胞의 각 fraction 의 ^{32}P 의 量을 表 2 에 表示하였다. Davidson⁽⁷⁾ (8) 은 Schmidt and Thannhauser 法

으로 測定한 RNA fraction 의 P 含量은 通常 이 fraction 에 RNA-P 以外の 磷酸化合物이 溶出되게 때문에 實際值보다도 若干 높은 值를 나타내게 된다고 指摘하고 있으나 本實驗에서도 表 2 에서 보는 바와 같이 DNA-P 및 protein-P 의 定量을 위해서는 가장 묽은 濃度(0.5 N)의 KOH 處理가 適當 하나 이러한 狀態下에서는 多量의 polyphosphate

Table 2. Amounts of ^{32}P in each Fraction of *Choreila* Cells.

Sample	No.	KOH Conc. (N)	^{32}P (μ mol/ml.)	Mean(or correct) Value	UV-Absorbance at	
					280	260
PCA-soluble total-P	1		17.52	16.35	0.16	0.43
	2		16.25		0.15	0.39
	3		16.26		0.15	0.40
	4		15.38		0.14	0.37
Ortho-P	1		3.06	4.09		
	2		3.95			
	3		4.13			
	4		5.23			
Nucleotidic Labile-P	1		2.41	2.14		
	2		1.97			
	3		2.04			
	4		2.16			
Poly-P "A"	1		1.88	2.03		
	2		2.11			
	3		2.08			
	4		2.07			
Sugar-P				8.26		
Lipid-P	1		17.66	16.48		
	2		16.27			
	3		16.08			
	4		15.94			
Poly-P "B" total-P	1		16.39	17.07	0.26	0.43
	2		16.67			
	3		15.91			
	4		19.32			
Poly-P "B" $\Delta 10\text{P}$	1		9.92	10.05		
	2		9.81			
	3		9.18			
	4		11.32			
Poly-P "C" $\Delta 10\text{P}$	1	0.5	0.85	13.76	/	/
	2	1	1.53		0.08	0.10
	3	2	5.55		0.10	0.12
	4	3	13.76		0.08	0.11
Residue	1	0.5	0.00			
	2	1	0.04			
	3	2	0.34			
	4	3	1.11			
DNA	1	0.5	2.34	2.34	0.26	0.28
	2	1	1.39		0.15	0.18
	3	2	0.67		0.07	0.09
	4	3	0.53		0.07	0.10
RNA	1	0.5	35.42	23.82	1.38	1.86
	2	1	35.41		1.50	2.04
	3	2	31.52		1.48	2.00
	4	3	23.82		1.29	1.78
Protein	1	0.5	1.22	1.22	0.44	0.49
	2	1	0.95		0.32	0.36
	3	2	0.73		0.29	0.30
	4	3	0.38		0.25	0.26

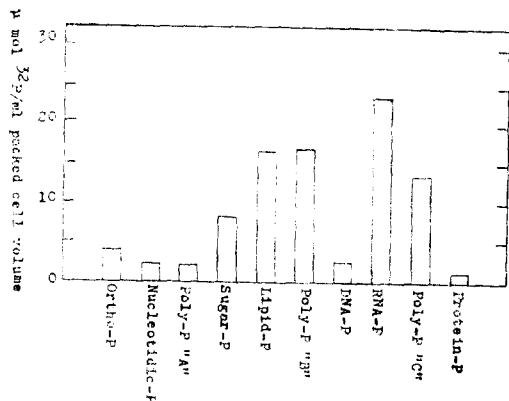


Fig. 1. Distaibution of ³²P in each fraction of *Chlorella* cells.

가 RNA fraction에 溶出됨을 알 수 있다. 따라서

Chlorella 細胞의 각종 磷酸化合物含量을 Fig. 1 과 같이 表示하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Chlorella* 細胞의 磷酸 含量은 RNA의 형태로 存在하는 것이 가장 많고 lipid-P에 이어서 polyphosphate "C" 및 "B"의 順으로 되어 있다. 그러나 세 fraction의 polyphosphate를 합하면 *Chlorella* 細胞에 가장 많이 存在하는 것이 polyphosphate이다. 그리고 DNA-P는 RNA-P의 量の 約 1/10 정도 밖에 存在하지 않으며 ortho-P도 不安定磷酸에 비하면 극히 少量이 存在할 따름이다.

γ-線으로 照射된 *Chlorella* 細胞의 照射後 培養過程에 있어서의 細胞內 各種 磷酸化合物의 轉換

表 3은 ³²P로 미라리 label한 *chlorella* 細胞를 γ-線으로 照射한 후 "cold" 標準培地에서 培養하는 등

Table. 3 Amounts of phosphate and radioactivities of ³²P in each fraction of *chlorella* cells.

Sample	Time of culture (hours)	³² P (CPM/L)		Total P (μ mol/L)	
		Control	Irrad.	Control	Irrad.
TCA extract	0	20,329	22,195	7.94	6.92
	5	26,598	21,886	14.17	10.52
	20	24,653	20,653	16.73	16.29
	45	27,446	19,261	43.66	22.32
Acid sol. nucleotidic Δ10P	0	2,216	3,538		
	5	5,495	3,755		
	20	4,885	3,067		
	45	7,704	2,733		
Lipid	0	34,029	30,971	10.68	8.72
	5	47,076	47,107	24.36	17.82
	20	46,708	52,052	23.50	23.55
	45	48,670	47,842	46.43	39.68
Poly-P "A"	0	4,396	3,815		
	5	13,737	6,965		
	20	16,387	12,386		
	45	20,828	9,859		
Poly-P "B" Δ10P	0	35,508	31,103	10.17	9.11
	5	46,717	35,975	14.53	13.94
	20	55,273	52,938	21.82	27.32
	45	37,700	44,588	36.66	48.17
Poly-P "C" Δ10P	0	31,248	27,732	11.01	10.02
	5	23,640	21,314	4.76	4.85
	20	20,758	33,803	6.40	11.98
	45	27,836	42,150	20.23	26.76
RNA	0	138,141	126,109	39.06	36.39
	5	138,119	125,444	45.19	38.28
	20	116,064	109,486	61.67	52.30
	45	126,153	98,150	139.70	116.98
DNA	0	8,672	7,653	3.79	3.08
	5	7,811	8,467	3.98	4.60
	20	15,011	12,522	10.21	8.55
	45	12,186	7,502	14.52	10.24
Protein	0	3,352	2,960	1.47	1.40
	5	3,269	3,196	1.34	1.50
	20	4,922	4,550	3.11	2.00
	45	6,966	3,742	7.00	5.03

안에 일어난 細胞內 각종 磷酸化合物의 ^{32}P 및 total P의 量的變化를 對照區의 그것과 比較한 것이다.

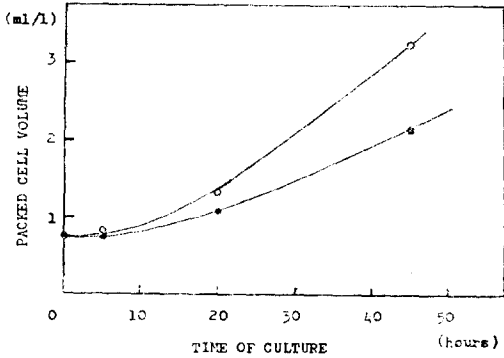


Fig. 2. Effect of cobalt-60 γ -ray irradiation on the subsequent growth of *chlorella*. Open circle, control; solid circle, irradiated.

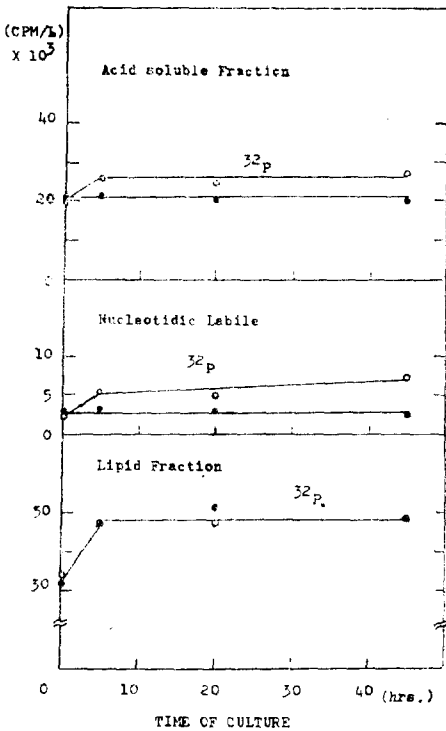


Fig. 3. Changes in amount of ^{32}P in the acid soluble, nucleotidic labile and lipid fraction of *chlorella* cells which were precultured in a ^{32}P -containing medium and later grown in a "cold" medium. Irradiation was held before the incubation in the "cold" medium. Open circle, control; solid circle, irradiated.

培養期間中の 細胞容量의 增加는 Fig. 2에 表示하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 培養液中の 細胞容量의 增加는 γ -線 照射區에 있어서는 45時間後에는 接種時의 約 3倍에 達하였고 非照射區에 있어서는 接種時의 約 5倍에 達하였다.

照射後 培養에 있어서의 *Chlorella* 細胞의 acid soluble fraction, nucleotidic labile 및 lipid fraction의 ^{32}P 및 total P의 量的變化는 Fig. 3 및 Fig 4에 각각 表示하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이

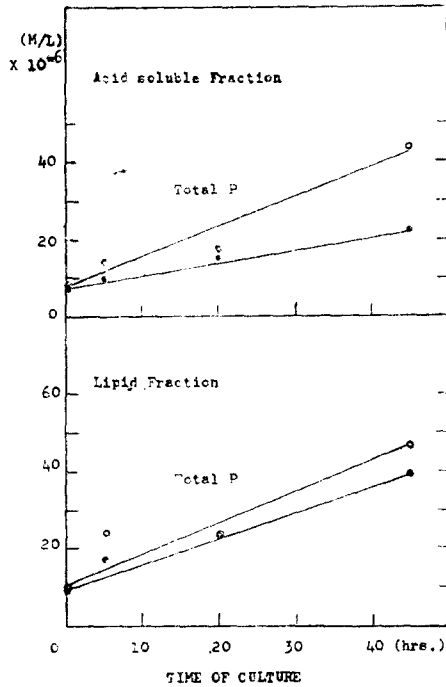
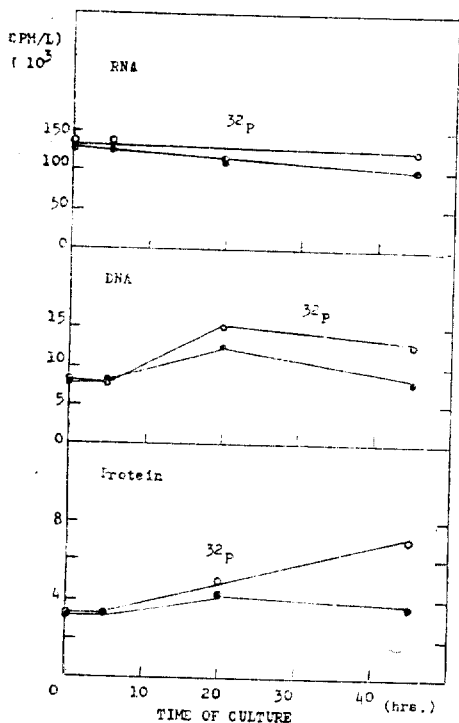


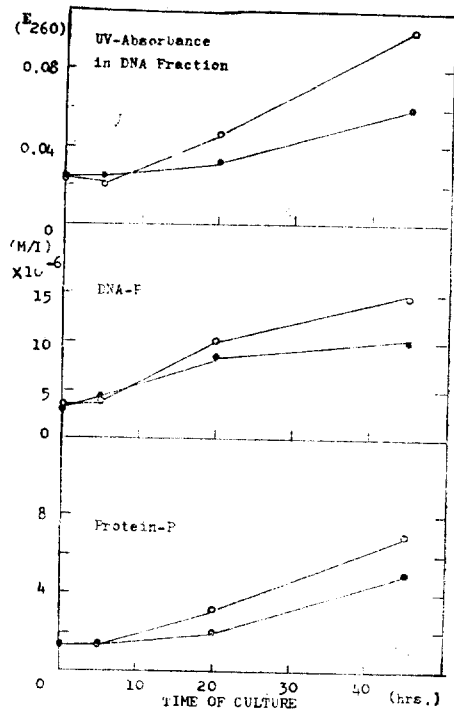
Fig. 4. Changes in amount of total phosphate in the acid soluble and lipid fraction of *chlorella* cells, during the culture of irradiated and nonirradiated normal cells. Open circle, control; solid circle, irradiated.

acid soluble fraction과 lipid fraction의 total P는 照射區에 있어서도 培養時間이 經過함에 따라 질차로 增加하였으나 對照區에 비해서는 약간 뒤떨어졌고 ^{32}P 의 量은 照射區나 對照區가 다같이 5時間 이후에는 一定値를 維持하였다. 照射區의 acid soluble nucleotidic labile P는 對照區의 그것에 비해 약간 높은 値를 維持하였다.

labeled *Chlorella*의 "cold" medium에 있어서의 照射後 培養過程에서 RNA, DNA 및 protein fra-



(Fig. 5)

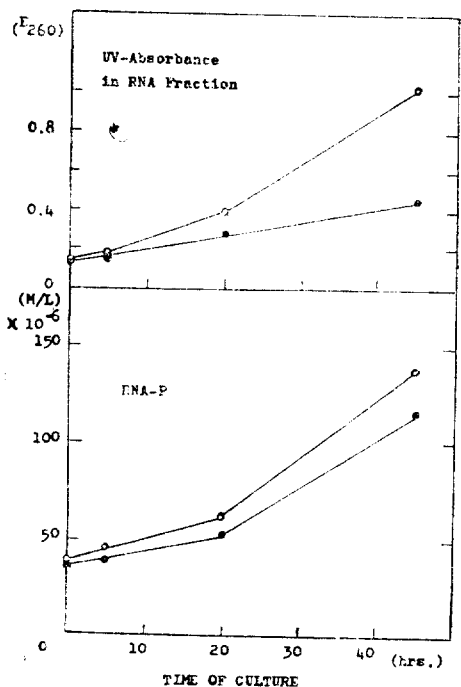


(Fig. 7)

Fig. 5. Changes in amount of ^{32}P in the RNA, DNA and protein fractions of *chlorella* cells which were precultured in a ^{32}P -containing medium and later grown in a "cold" medium. *Chlorella* cells were irradiated before the incubation in the "cold" medium. Open circle, control; solid circle, irradiated.

Fig. 6. Changes in amount of total phosphate and UV-absorbing material in the RNA fraction of *chlorella* cells, during the culture of irradiated and nonirradiated normal cells. Open circle, control; solid circle, irradiated.

Fig. 7. Changes in amount of total phosphate in the DNA and protein fractions of *chlorella* cells during the culture of irradiated and nonirradiated normal cells. Open circle, control; solid circle, irradiated.



(Fig. 6)

etion의 ^{32}P 含量的變化를 Fig. 5에 表示하고 RNA fraction의 total P와 DNA 및 protein fraction의 total P의含量的變化를 각각 Fig. 6과 Fig. 7에 表示한다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 非照射

對照區의 RNA fraction의 ^{32}P 의 量은 培養期間中 큰 變動이 없었으나 DNA 및 protein fraction의 ^{32}P 의 量은 培養時間이 經過됨에 따라 20時間 또는 그 後 까지도 漸次로 增加하였다. 그러나 照射區에 있어서는 이러한 DNA 또는 protein fraction의 ^{32}P 의 增加가 顯著히 抑制되었다. 이러한 事實은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 total P의 測定値에서는 더욱 明確히 나타났다. 卽 照射區의 DNA fraction과 protein fraction의 ^{32}P 및 total P의 量의 增加는 非照射對照區에 비해 顯著히 抑制되었다. 한편 RNA fraction의 ^{32}P 의 量은 照射區나 對照區에서 다같이 培養期間中 大개 一定值를 維持하였으나 total P 또는 紫外部 吸收物質의 量은 현저히 增加하였고 이러한 增加는 照射區에서는 相當히 뒤떨어졌다.

Fig. 8과 Fig. 9에는 照射後 培養過程에 있어서

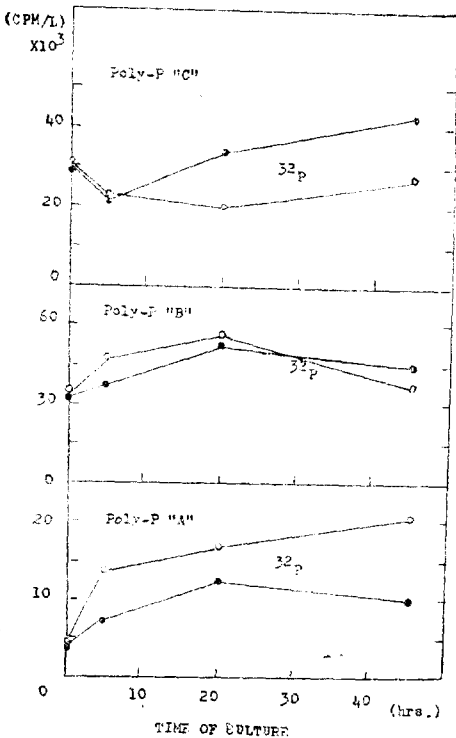


Fig. 8. Changes in amount of ^{32}P in the polyphosphate fractions of *Chlorella* cells which were precultured in a ^{32}P -containing medium and later grown in a "cold" medium. Irradiation of cells was held before the incubation in the "cold" medium. Open circle, control; solid circle, irradiated,

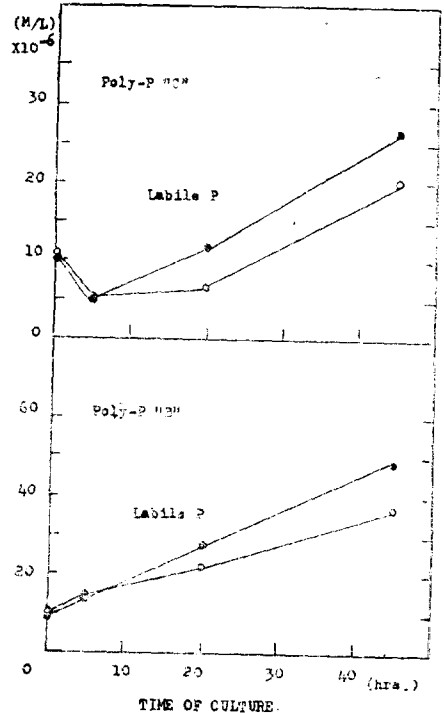


Fig. 9. Changes in amount of labile phosphate in the polyphosphate fractions of *Chlorella* cells, during the culture of irradiated and nonirradiated normal cells. Open circle, control; solid circle, irradiated,

의 *Chlorella* 細胞의 polyphosphate fraction의 ^{32}P 및 total P의 含量의 變化를 表示하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 poly-P "C" 및 poly-P "B" fraction에 있어서는 對照區에 비해 照射區에서 total ($^{32}\text{P} + ^{31}\text{P}$) labile P의 量이 培養時間의 經過와 더불어 漸次로 增加하였다. 그러나 poly-P "A" fraction의 ^{32}P 의 量은 照射區가 對照區에서보다 낮은 值를 維持하였다.

한편 poly-P "B" fraction에 있어서는 ^{32}P 의 量의 變化가 對照區와 照射區에서 큰 差異를 나타내지는 않았고 다같이 接種後 20時間까지는 약간의 增加를 보였으나 그후에는 약간 減少되었다. 이와는 對照的으로 Poly-P "C" fraction에 있어서는 ^{32}P 의 量이 처음에는 약간 減少되었으나 그후에 약간 增加하였고 이러한 增加는 特히 照射區에서 현저하였다.

考察 및 結論

Chlorella 細胞에는 多量의 不安定 磷酸이 主로 polyphosphate의 形態로 存在하고 있으며 다음으로 많은 것이 RNA-P로 DNA-P의 約 10 倍에 達하고 無機磷酸은 比較的 少量이 存在하고 있을 따름이다.

Miyachi 등 (19) (21) 은 *Chlorella* 와 시금치에서 酸不溶性非脂質 標品을 2 N KOH 로 處理하고 上澄液을 PCA 로 中和하여 所謂 poly-P "C"를 共沈 分離하고 있는데 表 2에서 보는 바와 같이 이러한 處理로는 polyphosphate가 完全히 分離되지 아니하고 보다 많은 量의 poly-P가 RNA fraction에 溶出되어 나온다. 뿐만 아니라 2 N KOH 處理에 依해서도 相當量의 DNA-P 및 protein-P가 分解되어 RNA fraction에 溶出된다. 따라서 한 標品으로부터 poly-P, DNA, RNA 및 protein-P를 동시에 測定코지 할 때는 KOH의 濃度를 halb로 높히는 것 보다는 RNA fraction에서 直接 poly-P를 分離하는 것이 좋은 것으로 生覺된다.

最近에 Correll 등 (5) 은 *Chlorella* 에서 RNA-poly-P complex를 分離하였는데 그 分割操作으로 보아 poly-P "B" fraction에는 一部の RNA-poly-P complex가 溶出되어 나온 것으로 生覺되나 一部는 그대로 RNA fraction에 溶出되어 나온 것 같다. 따라서 從來에 Schmidt and Tannhauser法으로 細胞를 分割하여 磷酸을 定量한 DNA 및 RNA의 測定值(21)에서 볼 수 있었던 RNA 量의 過多는 RNA fraction에 溶出되는 poly-P의 分離가 不完全하였던 때에 큰 原因이 있었던 것 같다.

生細胞內에 있어서의 poly-P의 向方에 대해서 Kaltwasser (18) 는 *Hydrogenomonas* 에서 poly-P는 安定한 酸不溶性物質로 轉換된다고 하였고 Miyachi and Tamiya (21) (22) 는 *Chlorella* 를 재료로 하여 poly-P가 DNA 및 protein-P로 轉換된다고 하였다. Harold (11) 도 ³²P로 label 한 *Neurospora* 를 P-free media에서 培養하였을 때 ATP 및 poly-P의 放射能은 減少되고 核酸 및 phospholipid fraction의 放射能은 增加함을 觀察하였으나 poly-P에서 直接 만들어 지는 것은 ATP가 아니라 ortho-P라고 推定하였다. Hughes 등은 (12) 光合成細菌 *Chlorobium* 에 의하여 poly-P가 ADP의 存在下에 ortho-P를 遊離하는 것을 觀察하고 있다.

Cherry (4), Ledoux (17) 등은 X-線照射에 의한 生

細胞의 protein, DNA, acid soluble nucleotide 및 RNA 合成의 減少를 報告하였고 Hall (10) 는 X-線照射로 protein 및 ATP의 合成率이 減少된다고 하였다. Toropova (20) Palecek (23) 등은 X-線照射로 DNA의 量이 減少될 뿐만 아니라 purine이 破壞 또는 遊離되어 DNA의 G/C, A/T值가 變化된다고 하고 있다. 그러나 nucleotide 또는 nucleoside內의 base의 放射線感受性은 purine과 pyrimidine이 同----하고 (25) desoxyribonucleoprotine에 비해서는 DNA가 크다는 見解(27)도 있다. 本研究에서는 70,000 r의 γ -線의 照射로 DNA, nucleotidic labile P 및 protein fraction의 P含量이 對照區에 비해 減少된때 反하여 poly-P "B" 및 poly-P "C" fraction의 P含量은 對照區에서보다도 照射區에서 오히려 增加되었다. 따라서 *Chlorella* 細胞의 poly-P로부터의 nucleotide, DNA 및 protein의 合成이 γ -線의 照射로 抑制된 것으로 볼 수 있다.

Agostini (1) 는 X-線照射로 細胞의 ³²P-nucleotide는 減少되나 脂質은 增加된다고 하였고 Kainova (16) 는 γ -線으로 照射된 細胞의 cephalin은 減少되나 lecithin, sphingomyelin의 量은 增加된다고 하였다. 그러나 本實驗條件下에서는 脂質代謝에 미치는 γ -線의 뚜렷한 影響을 찾아 볼 수 없었다.

*Chlorella*의 同調培養過程에 있어서의 磷酸代謝에 관한 研究에서 Miyachi (20) 등은 *Chlorella* 細胞內에서 poly-P "C"는 poly-P "A"로 轉換되는 것을 觀察하고 있다. 本研究에서 γ -線의 照射로 poly-P "B" 및 poly-P "C"로부터의 DNA의 合成이 抑制된 照射區의 poly-P "C" fraction의 ³²P가 "Cold" medium에서의 培養에서 接種後 45時間까지도 계속 增加하였는데 이와는 對照의으로 poly-P "B" fraction의 ³²P는 減少하였다는 것은 *Chlorella* 細

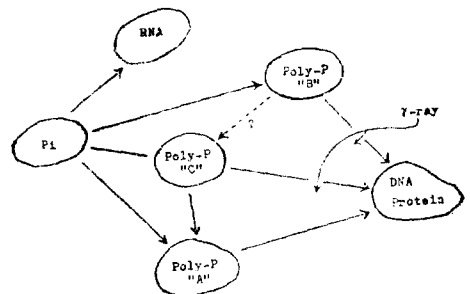


Fig. 10. Schematic representation of radiation effects on phosphate metabolism in *Chlorella*.

胞의 poly-P "B"는 poly-P "C"로 轉換된다는 것을 나타내는 것 같다. 그리고 本研究의 非照射 對照區의 ^{32}P 가 poly-P "C" fraction에 있어서는 培養初期에 약간 減少한데 비해 DNA, protein, acid soluble nucleotide fraction에 있어서 약간 增加하였고 RNA fraction에 있어서는 대개 一定值를 維持

하였다는 것은 DNA나 蛋白質의 合成에는 主로 細胞內의 poly-P가 利用되고 RNA 合成에는 培地中の 無機磷酸이 利用된다고 하는 見解⁽²¹⁾⁽²²⁾와 完全히 一致된다. 따라서 *Chlorella*의 磷酸代謝 特別히 poly-P를 中心으로 하는 代謝經路를 Fig. 10과 같이 그려보았다.

摘 要

1. ^{32}P 로 均等히 label한 *Chlorella*를 使用하여 細胞內의 各種 磷酸化合物含量을 測定하였다. ^{32}P 로 미리 label한 細胞를 cobalt-60 γ -線으로 照射한 후 正常的인 "cold" media에 接種하여 培養하고 接種時와 培養의 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 여러가지 cell fraction에 있어서의 total P 및 ^{32}P 의 含量을 測定하였다.

2. *Chlorella* 細胞의 磷酸含量은 RNA의 형태로 存在하는 것이 가장 많고 다음이 lipid-P, poly-P "C", poly-P "B", sugar-P, ortho-P, DNA-P, nucleotidic labile-P, poly-P "A", 및 protein-P의 順으로 되어 있다. 그러나 세가지 fraction의 poly-P를 합하면 RNA-P와 對等한 量의 poly-P가 *Chlorella* 세포에 存在하며 DNA-P의 量은 RNA-P의 量의 約 $1/10$ 정도이다.

3. γ -線에 照射된 細胞의 培養에서 DNA, nucleotidic labile-P 및 蛋白質의 合成은 對照區에 비해 顯著히 抑制되었으나 poly-P "B" 및 poly-P "C" fraction에 있어서는 total P의 量이 培養時間이 經過됨에 따라 對照區보다도 顯著히 增加하였다. 따라서 γ -線의 前處理는 poly-P "B" 및 poly-P "C"로부터의 DNA 및 蛋白質의 合成을 抑制하는 것으로 生覺된다.

4. 正常的인 "cold" medium에서의 培養에서 poly-P로부터의 DNA 및 蛋白質의 合成이 抑制된 照射細胞의 poly-P "C" fraction의 ^{32}P 의 量은 poly-P "B" fraction의 ^{32}P 의 量의 減少와는 對照의 順으로 漸次로 增加하였다. 따라서 正常的인 *Chlorella* 細胞의 poly-P "B"는 poly-P "C"로 轉換되는 것으로 推定할 수 있었다.

REFERENCES

1. AGOSTINI, C. and A. SESSA, 1962. Effects of X-ray on rat liver: Behaviour of adenine nucleotides, water and total lipids. *Int. J. Rad. Biol.*, 5, 155-166.
2. ARNON, D. I., 1938. Microelements [in culture-solution experiments] with higher plants. *Amer. J. Bot.*, 25, 322-325.
3. BERENBLUM, I. and E. CHAIN, 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, 32, 295-298.
4. CHERRY, J. H., HAGEMAN, R. H., F. I. COLLINS and FLESHER, 1961. Effects of irradiation on corn seed. *Plant Physiol.*, 36, 566-572.
5. CORRELL, D. L. and N. E. TOLBERT, 1962. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. 1. Isolation & physiology. *Plant Physiol.*, 37, 627-636.
6. CRANE, R. K. and F. LIPMAN, 1953. The effects of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 201, 235-243.
7. DAVIDSON, J. N., 1957. The biochemistry of the nucleic acids. John Wiley & Sons. Inc., Japanese Edition, 88.
8. DAVIDSON, J. N., FRAZER, S. C. and HUTCHISON, W. C., 1951. *Biochem. J.*, 49, 311. DAVIDSON, J. N., and SMELLIE, R. M., 1952. *ibid.*, 52, 594-599.
9. FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375.
10. HALL, J. C., A. L. GOLDSTEIN, and SONNENBLICK, B. P., 1963. Recovery of

- oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after whole body irradiation. *J. Biol. Chem.*, 238, 1137—1140.
- 11). HAROLD, F. M., 1962. Depletion and replenishment of the inorganic polyphosphate pool in *Neurospora crassa*. *J. Bact.*, 83, 1047—1057.
 - 12). HUGHES, D. E., CONTI, S. F., and R. C. FULLER, 1963. Inorganic polyphosphate metabolism in *Chlorobium thiosulfatophilum*. *ibid.*, 85, 577—584.
 - 13). IWAMURA, T., 1960. Distribution of nucleic acids among subcellular fractions of *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 161—163.
 - 14). IWAMURA, T., 1961. Cellular distribution and properties of nucleic acid species in *Chlorella*. *Symposia on Microbiology, The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo*. 3, 259—278 (in Japanese).
 - 15). KAINOVA, A. S., 1961. The effect of ionizing radiation on the phospholipid metabolism in the liver. *Biokhimiya (Transl.)*, 25, 415—418. *Biol. Abst.* 1961. (2948)
 - 16). KALTWASSER, H., 1962. Die Rolle der Polyphosphate im Phosphatstoffwechsel eines Knallgasbakteriums. *Arch. Mikrobiol.* 41, 382—306.
 - 17). LEDOUX, L., P. GALAND, and R. HUART, 1962. Nucleic acid protein metabolism of barley seedlings. III. Effects of x-ray. *Rad. Bot.*, 2, 119—124.
 - 18). LEE, Y. N., Effects of Cobalt-60 γ -ray irradiation on the physiological and biochemical activities of *Chlorella*. *Kor. J. Bot.* 7.
 - 19). MIYACHI, S., 1961. Inorganic polyphosphate in spinach leaves. *J. Biochemistry*, 50, 364—371.
 - 20). MIYACHI, S. and S. MIYACHI, 1961. Modes of formation of phosphate compounds and their turnover in *Chlorella* cells during the process of life cycle as studied by the technique of synchronous culture. *Plant & Cell Physiol.*, 2, 415—424.
 - 21). MIYACHI, S. and H. TAMIYA, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *ibid.*, 2, 405—414.
 - 22). MIYACHI, S. and H. TAMIYA, 1961. Some observation on the phosphorus metabolism in growing *Chlorella* cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 46, 200—202.
 - 23). PALECEK, E., 1961. Effect of ionizing radiation on RNA: III. The structure of highly polymerized DNA from irradiated rat spleen. *Folia Biol. (Prague)*, 7, 61—65. *Biol. Abst.* 1961. (47282).
 - 24). SCHMIDT, G. and S. J. TANNHAUSER, 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphorprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161, 93—89. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse (K. PAECH & M. V. TRACEY)* 4, 259. 1955.
 - 25). SCHOLES, G., J. F. WARD and J. WEISS, 1960. Mechanism of the radiation induced degradation of nucleic acids. *J. Molecular Biol.*, 2, 379—391.
 - 25). TOROPOVA, G. P., 1957. The action of x-rays on nucleic acid metabolism in the liver. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 114, 454—547. *Biol. Abst.*, 1961, (39709).
 - 27). TSEITLIN, P. I., T. UGAROVA, V. KLI-MOV and T. SOKOLOVA, 1960. Differences in radiosensitivities of desoxynucleoprotein and desoxyribonucleic acids. *Biokhimiya (Transl.)*, 25, 92—96.