<報　文>

燐酸缺乏培地에 있어서의 *Chlorella* 細胞內의 燐酸化合物의 轉換

李 永 祿·沈 雄 燮
(高麗大學校 理工大學 生物學科)

Turnover of Phosphate Compounds in *Chlorella* cells in a P-free medium.

LEE, Yung-Nok & Woong-Seop SIM
(Department of *Biology*, Korea University)

ABSTRACT

Using the *Chlorella* cells which had been uniformly labeled with ^{32}P, the distribution of phosphorus in various fractions of cell material was investigated. Uniformly ^{32}P-labeled *Chlorella* cells were futher grown in a P-free medium, and some portions of the cells were taken out at intervals during the culture, and subjected to analyze the contents of ^{32}P in various fractions of the cell constituents.

2. Analysis of the ^{32}P-labeled *Chlorella* cells showed that the highest in P-content was the fraction of RNA followed by those of lipid, RNA-polyphosphate complex, acid-insoluble polyphosphate, acid-soluble polyphosphate, DNA and protein.

3. During the culture of ^{32}P-labeled *Chlorella* cells in a P-free medium, amounts of phosphate in DNA, protein and lipid fractions increased, while the P-contents in the fraction of RNA-polyphosphate complex decreased as well as those of acid-insoluble polyphosphate and acid-soluble polyphosphate fractions.

4. It was inferred that phosphorus used in the syntheses of DNA and protein was taken from polyphosphates of the cells, and RNA-polyphosphate complex would play an important role as a phosphate pool.

緖　　論

Belozersky & Kulayer(1957), Winder & Denney(1959)등은 *Aspergillus* 및 *Mycobacteria*에서 각각 RNA-polyphosphate complex를 分離한 바 있고 最近에는 Correll과 Tolbert(1992, 1964, 1965)가 *Chlorella* 및 *Anabaena* 등에서 RNA-polyphosphate complex가 多量으로 存在한다는 것을 明白히 하였다. 그러나 細胞의 燐酸代謝에 있어서의 RNA-polyphosphate complex의 役割에 대해서는 아직도 아는 바가 거의 없다.

本實驗에서는 *Chlorella*의 燐酸代謝에 있어서의 RNA-polyphosphate complex의 役割을 究明코저 ^{32}P로 比較的 均等히 labell한 *Chlorella* 細胞를 使用하여 이를 光合成條件下에서 P-free medium에서 培養하고 培養의 中間期에 收穫한 細胞들을 각각 RNA-polyphosphate, DNA, Protein, RNA, lipid, 및 polyphosphate 등으로 分劃하여 細胞內의 燐酸化合物의 含量과 그의 轉換을 追跡한 結果 몇 가지 所見을 얻었기에 報告하는 바이다.

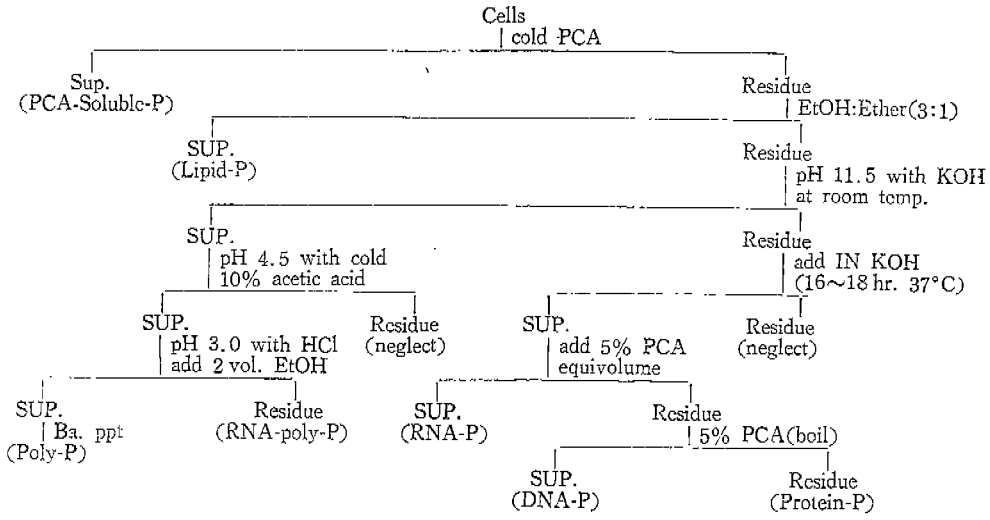
材 料 와　方 法

*Chlorella ellpsoidea*를 0.4 mC/L의 ^{32}P-phosphate를 包含하는 normal medium에 接種하여 20～25°C에서 培養하였다. 培地의 組成은 dist water L當 5g KNO_3, 2.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.25g KH_2PO_4, M/100 $FeSO_4$ 1cc 및 1ml의 A-

rnon's A_5 Solution을 含有하고, 培養期間中 계속하여 CO-enriched air로 bubbling 시키고 約 10,000 lux의 照明을 維持하였다. 細胞의 packed volume이 接種時의 約 10倍에 達하였을 때 細胞를 收穫하여 1/500M K_2SO_4 溶液으로 3回 씻고, 一定量의 細胞를 取하여 P-free medium에 接種하고 前과 同一한 培養條件下에서 培養하였다. 接種時의 培養의 中間期(10時間, 20時間, 30時間, 45時間, 70時間)에 一定量의 細胞를 收穫하여 1/500 M K_2SO_4 溶液으로 3回 씻은 후 細胞를 DNA, RNA, protein, lipid, RNA-polyphosphate complex, acid-soluble 및 insoluble polyphosphates 등 여러 가지 fraction으로 分劃하였다.

燐酸化合物의 分劃操作; 接種時와 培養의 中間期에 收穫한 細胞는 Table 1과 같은 순서로 分劃하였다.

Table 1. Fractionation of Phosphate Compounds in *Chlorella*.



DNA 및 RNA 分離는 Schmidt & Thannhauser(1945)法에 依據하였고, RNA-polyphosphate의 分離는 Correl & Tolbert(1962) 方法과 本質的으로 同一한데, 細胞의 處理順序는 다음과 같다.

(Ⅰ) 5%의 cold PCA로 3回(30分間, 15分間, 15分間), (Ⅱ) EtOH−ether(3 : 1)로 4回(每回 3分間), (Ⅲ) dilute KOH로 pH 11.5로 하여 3回(1時間, 30分間, 15分間) 抽出한 後 residue는 (Ⅳ) 1 N KOH로 37°C에서 16~18 hr. 동안 處理한 後 沈澱物을 除去하고, (Ⅴ) 上澄液에 5% PCA를 加하여 遠心分離 後 上澄液을 RNA-P로 보고 (Ⅵ) residue에 5% PCA를 加하여 100°C에서 10分間 加熱하여 蛋白質을 沈澱시켰다.

分析 : 各 fraction의 phosphate의 含量은 各各 그들의 放射能을 測定하여 細胞를 label한 培地와의 比放射能으로부터 μmol로 計算하였다.

Orthophosphate : 操作 Ⅰ에서 얻은 上澄液 1 cc를 取하여 IN H_2SO_4 0.5 ml., M/100 ammonium molybdate 0.8 ml., dist. water 2.7 ml., 및 isobutanol 3.0 ml.,를 加하여 세게 흔든 다음 isobutanol 層을 取하여 그의 放射能을 測定하였다.

Acid-soluble polyphosphate : 操作 Ⅰ에서 얻은 上澄液에 3% metaphosphate를 carrier로 加하여 IN KOH 溶液으로 pH를 4.0으로 調節한 後 pH 4.0인 acetate buffer와 conc. $Ba(NO_3)_2$ 溶液을 加하여 5°C에서 16~18 hr. 동안 放置 後 遠心分離하여 沈澱物에 IN HCl를 加하여 溶解시킨 후 그의 放射能을 測定하였다.

Phospholipid : 操作 Ⅱ에서 얻은 上澄液을 lipid fraction으로 보고 그의 少量을 取하여 放射能을 測定하였다.

RNA-P : 操作 Ⅴ에서 얻은 上澄液을 RNA-P로 보고 그의 少量을 取하여 放射能을 測定하였다.

DNA-P and protein-P : 操作 Ⅵ에서 얻은 上澄液을 DNA-P, 沈澱物을 protein-P로 보고 이 沈澱物을 IN KOH로 溶解시켜서, 各各 그의 放射能을 測定하였다.

RNA-polyphosphate complex : 操作 Ⅲ에서 얻은 上澄液을 10% acetic acid solution으로 pH를 4.5로 調節한 後 0°C에서 1時間 處理하여 遠心分離시켜서 沈澱物을 除去하고, 그의 上澄液을 dilute HCl로 pH를 3.0으로 調節한 後 2倍의 EtOH를 加하여 遠心分離시켜서 沈澱物을 RNA-polyphosphate Complex로 보고, 이 沈澱物을 pH 11.5 溶液으로 溶解시켜 그의 放射能을 測定하였다.

Acid.insoluble polyphosphate : 操作 Ⅲ에서 얻은 上澄液에서 RNA-polyphosphate complex 沈澱物을 얻은 上澄液 一定量을 取하고 여기에 $Ba(NO_3)_2$를 加하여 沈澱시켜 遠心分離시킨 後 이 沈澱物을 IN HCl 溶液으로 溶解시켜 그의 放射能을 測定하였다.

實 驗 結 果

P-free medium에서 培養하는 동안에 이루난 packed cell volume의 變化는 Fig. 1에 表示하였다.

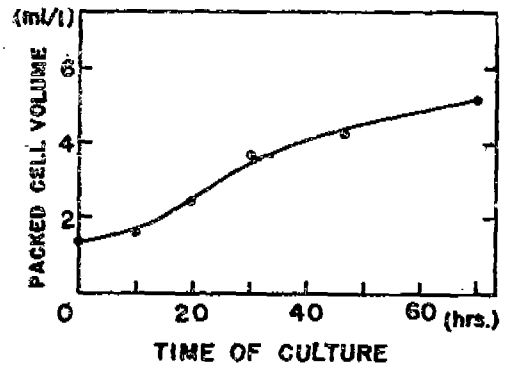


Fig. 1. Changes in packed cell volume during the culture in the P-free medium.

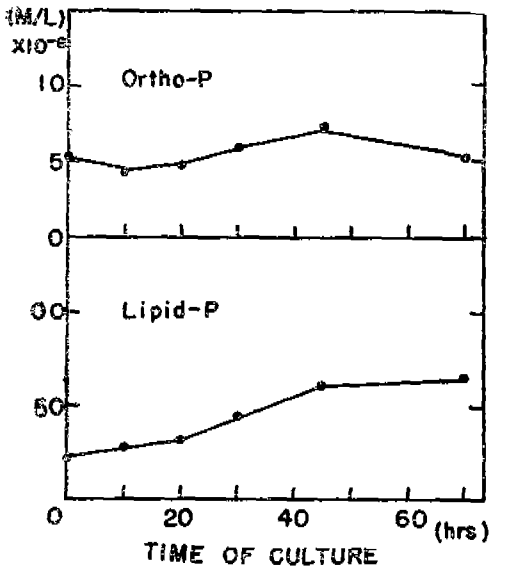


Fig. 2. Changes in amounts of labile ^{32}P in the fractions of inorganic phosphate and lipid in *Chlorella* cells which had been precultured in ^{32}P-containing medium and later grown in a P-free medium.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, ^{32}P를 含有한 standard medium에서 자란 *Chlorella* 細胞를 P-free medium에 接種하여 培養 70時間 後에는 細胞의 packed cell volume이

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

Sample	Time of culture(hr.)	^{32}P (cpm/L)	^{32}P (μmol/L)
Ortho-P	0	5,070	5.353
	10	4,182	4.417
	20	4,679	4.94
	30	5,200	5.49
	45	7,155	7.338
	70	4,750	5.124
Acid-soluble poly-P	0	5,525	5.834
	10	5,720	6.041
	20	4,883	5.155
	30	3,996	4.218
	45	2,848	3.006
	70	3,165	3.341
Lipid-P	0	20,007	21.129
	10	26,861	28.365
	20	29,400	31.047
	30	44,500	46.995
	45	59,280	62.604
	70	62,595	65.099
Acid-insoluble poly-P	0	9,262	9.797
	10	9,753	10.299
	20	8,596	9.076
	30	7,369	7.781
	45	3,910	4.128
	70	2,932	3.096
RNA-poly-P complex	0	14,250	15.042
	10	13,545	13.830
	20	11,498	12.125
	30	8,625	9.107
	45	4,650	4.886
	70	4,550	4.813
RNA	0	52,624	55.576
	10	54,540	57.508
	20	51,819	54.735
	30	50,270	53.07
	45	46,640	49.253
	70	42,020	43.377
DNA	0	1,485	1.587
	10	1,580	1.668
	20	1,715	1.809
	30	2,242	2.366
	45	3,825	4.038
	70	5,826	6.053
Protein	0	395	0.415
	10	493	0.522
	20	608	0.642
	30	850	0.880
	45	1,575	1.558
	70	1,775	1.873

接種時의 約 四倍로 增加했다.

^{32}P로 均等히 labcl한 *chlorella* 細胞의 各 fraction의 ^{32}P의 量은 Table 2에 表示하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 ^{32}P 含量이 가장 높은 것은 RNA-fraction이며, 다음에 lipid fraction에 이어서 RNA-polyphosphate fraction, acid-insoluble polyphosphate fraction 순으로 되어 있으며, profein-P가 가장 낮은 率을 보이고 있다.

^{32}P로 미리 label한 *Chlorella* 細胞를 P-free medium에서 培養하는 동안에 inorganic phosphate와 lipid fraction에 있어서의 ^{32}P의 量的 變化는 Fig. 2에 表示하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 inorganic phosphate는 不規則한 變化를 보였고 lipid fraction의 ^{32}P의 含量은 완만한 增加를 보였다.

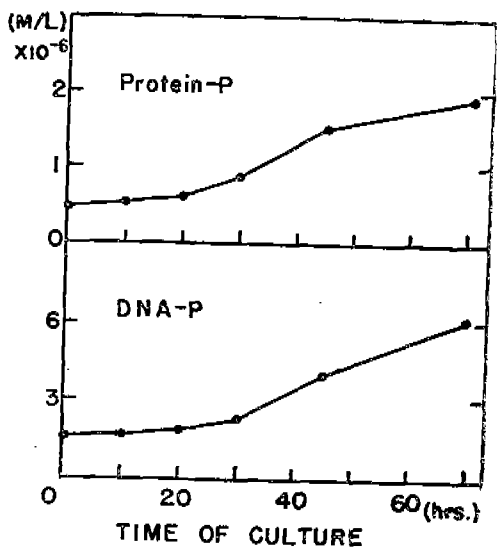


Fig. 3. Changes in amounts of labile ^{32}P in the protein and DNA fractions of *Chlorella* cells which had been precultured in ^{32}P-containing medium and later grown in a P-free medium

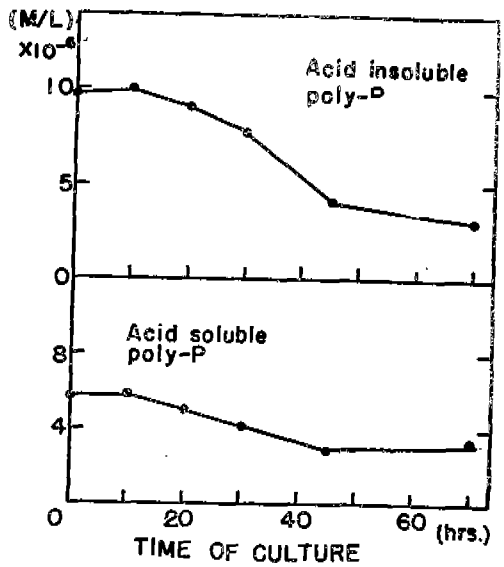


Fig. 4. Changes in amounts of ^{32}P in the fractions of acid-insoluble poly-P and acid soluble poly-P in *Chlorella* cells which had been precultured in P-containing medium and later grown in a P-free medium.

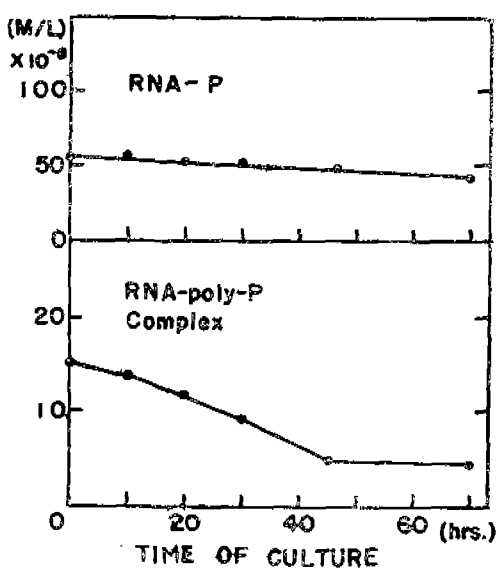


Fig. 5. Changes in amounts of ^{32}P in the RNA and RNA-polyphosphate complex fractions of *Chlorella* cells which had been precultured in ^{32}P-containing medium and later grown in a P-free medium.

Fig. 3에는 protein fraction과DNA fraction에 있어서의 ^{32}P의 量的 變化를 表示하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 protein fraction과 DNA fraction에 있어서의 ^{32}P의 含量은 培養初의 約 四倍로 增加하였다.

acid-insoluble polyphosphate와 acid-soluble polyphosphate에 있어서의 ^{32}P의 量的變化는 Fig. 4에 表示하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 acid-insoluble polyhosphate fraction에서의 ^{32}P의 量的變化는 顯著한 減少를 보였다.

Fig. 5에는 RNA-polyphosphate complex 및 RNA fraction내의 ^{32}P의 量的變化를 表示 하였는데, RNA-fraction에서의 ^{32}P 含量은 培養期間中 거이 變化하지 않았으나, RNA-poryphosphate complex의 ^{32}P의 量的變化는 培養初부터 顯著한 減少를 보였다.

考察 및 結論

最近 David L. Correll과 N.E. Tolbert(1962, 1964, 1965)는 *Chlorella*와 *Anabaena*에서 RNA-polyphosphate complex를 分離하였는데, 왕성하게 자라는 *Anabaena* 細胞에서는 total phosphorus의 約40~50%가 polyphosphate狀態이고, 그 중 約 30%는 RNA-polyphosphate 狀態로 存在하고 있다고 밝혔는데, 本實驗에서는 RNA-polyphosphate complex는 全 polyphosphate의 約 50% 정도였다. Belozersky와 Kulaev(1959)는 RNA와 polyphosphate 사이에 Chemical bonds가 存在하고 있다는 것과, ^{32}P-phosphate는 RNA-polyphosphate狀態로 빨리 轉換된다는 것을 밝혔다. DNA나 protein을 合成하는데 使用되는 P는주로 polyphosphate에서 공급되며, 반면에 RNA 및 polyphosphate 合成에 使用되는 P는 大部分 細胞外의 Surrounding medium의 inorganic phosphate에서 공급 받는다고 Miyachi, S.와 Tamiya, H.(1961)는 보고했다. 本實驗에서는 polyphosphate 및 RNA-polyphosphate complex가 培養初부터 顯著한 減少를 보였기 때문에 DNA나 protein合成에 使用되는 P는 polyphosphate 및 RNA-polyphosphate complex에서 공급되는 것으로 生覺할 수 있다, Joe L. Key(1964)는 RNA와 protein 合成은 Cell elongation에 必須的 過程이라는 것을 밝혔으며, Correll과 Tolbert (1962)는 同調培養法으로 培養한 *Chlorella* 細胞의 RNA-polyphosphate complex는 培養初 9時間까지는 增加했으나 그 후에 減少했다는 것을 밝혔다. 本實驗에서는 RNA-polyphosphate complex가 처음부터 계속 減少를 보인 것은 P-free medium에서 培養했기 때문에 RNA-polyphosphate 合成은 不可能하고 다만 ^{32}P가 DNA 및 protein-P로 轉換되었기 때문에 培養初부터 減少現象을 보인 것으로 生覺된다. 이상의 것을 要約하면, P-free medium에서 培養하는 동안에 細胞의 polyphosphate, 즉히 RNA-polyphosphate complex의 P가 直接 또는 間接的으로 DNA 및 protein-P로 轉換한 것으로 生覺할 수 있고, RNA-polyphosphate complex는 polyphosphate와 마찬가지로 phosphate metabolism에 있어서 phosphate pool로써 役割을 한다고 生覺된다.

摘 要

^{32}P로 均等히 label한 *Chlorella* cells를 P-free medium에서 培養하여 培養初와 培養 도중에 一定量의 細胞를 收穫하여 여러가지 fractions에 있어서의 ^{32}P의 含量을 測定하였다.

1. *Chlorella* cells의 ^{32}P의 含量은 RNA-fraction이 가장 높고, 다음에 lipid, RNA-polyphosphate complex, acid-insoluble polyphosphate, acid-soluble polyphosphate, DNA 및 protein fraction順이었다.
2. label한 細胞를 P-free medium에서 培養하는 동안에 DNA 및 protein의 ^{32}P量은 增加했고, 반면에 RNA-polyphosphate fraction에서는 polyphosphate fraction과 마찬가지로 ^{32}P量은 減少했다.
3. DNA와 protein 合成에는 polyphosphate, 즉히 RNA-polyphosphate complex가 使用되는 것으로 生覺된다.
4. 따라서 RNA-polyphosphate complex는 polyphosphate metabolism에서 phosphate pool로써 役割한다고 生覺된다.

文 獻

1. Arnon, D. I., 1938. Microelements in culture-solution experiments with higher plar. Amer. J. Bot., 25, 322-325.
2. Belozersky, A. N and I. S. Kulayev. 1957. Polyphosphate and their significance in the development of *Aspergillus niger*. Bioch., 22, 27-36.
3. Correll, D. L. and Tolbert, N. E. 1962. Ribonucleic acid-poly-phosphate from algae. Plant Phosiol., 37, 627-636.
4. Correll, D. L. and N. E. Tolbert, 1964 Ribonucleic acid-Poly-phosphate from algae. II. Physical and Chemical properties of the isolated complexes. Plant Physiology, 5, 171-191.
5. Correll, D. L., 1965. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. III. Hydrolysis studies. Plant & Cell Physiology., 6,

661-669.

6. Harold, F. M. 1964. Enzymic and Genetic control of polyphosphate accumulation in *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbio., 35(1), 81-90.
7. Joe L. Key. 1964. Ribonucleic acid and protein synthesis as essential processes for cell elongation. Plant Physiol., 39, 365-370.
8. Lee, Yung Nok. 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella*, with special reference to polyphosphate. Kor, J. Microbio., 2, 1-11.
9. Miyachi, S. and Tamiya, H. 1961. Distribution and turnover of Phosphate componds in growing *Chlorella* cells. Plant Physiol., 2. 405-414.
10. Shimidt, G. and Thannhauser, S. J. 1945. A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoprotein in animal tissue. J. Biol. Chem., 161, 83-89.
11. Winder, F. G. and J. M. Denneny, 1956. Phosphorus melablism of Mycobacteria. Determination of phosphorus compounds in some Mycobacteria. J.Gen. Microbiol. 15, 1-18.