Chlorella 細胞의 核酸 燐蛋白質 및 燐脂質의 生合成에 미치는 마그네슘의 缺乏 効果

李 永 祿 · 李 鍾 三
(高麗大學校 大學院 生物學科)

Effect of magnesium-deficiency on the biosynthesis of nucleic acid, phosphoprotein, and phospholipid in *Chlorella* cells.

LEE, yung-nok, and Chong-sam LEE
(Dept. of Biology, Korea University)

ABSTRACT

Chlorella ellipsoidea were grown in a Mg-free medium. Aliquots of the algal cell were taken out at the beginning and predetermined time intervals during the culture and were analyzed the contents of phosphate in various fractions of the cell constituents. The results obtained were compared with those of the control.

When *Chlorella* cells were grown in a Mg-free medium, the contents of phosphate in the DNA protein, RNA-polyphosphate complex, nucleotidic-labileP, and PCA-soluble, fractions decreased compared with those of the control, while the content of acid insoluble polyphosphate increased significantly. On the otherhand, RNA-P and lipid-P showed the tendency of decrease at the early stage of the culture, but they were increased more than those in the control as culutre proceeds.

It is showed that phosphate turnover from acid-insoluble polyphosphate into DNA, protein, and RNA-polyphosphate complex was inhibited by magnesium-deficiency of the cells.

緖 論

Démétriadèa & Holvas (1958) Burdine & Howard (1959) Yamaguchi & Tokatori & Lorenz(1960) 等 많은 學者들이 여러가지 綠色 植物에서 마그네슘이 缺乏하면 葉綠素의 生成이 抑制되어 黃白化가 일어난다는것을 報告한바 있거니와 Aoki & Hase(1964) 等은 *Chlorella* 細胞의 葉綠體 發生 過程에서 먼저 細胞의 RNA 含量이 增加한 다음에 蛋白質 含量이 增加되고 그 後 葉綠素 形成이 일어 난다는 것을 報告한바 있다.

마그네슘의 缺乏이 核酸, 蛋白質, 脂質과 같은 體物質의 生合成 過程에는 어떠한 영향을 미치는가 하는 것은 葉綠素 形成에 미치는 마그네슘의 作用과 關聯하여 極히 興味있는 일이라 생각된다.

本 實驗에서는 *Chlorella*를 마그네슘 缺乏培地에서 培養하고 培養初와 培養의 中間 時期에 一定量의 細胞를 收穫하여 DNA, RNA, 蛋白質, 脂質, 酸不溶性 포리燐酸, 酸可溶性 포리燐酸, RNA-포리燐酸 複合體 等 여러가지 分劃區로 細胞를 分劃하여 그 含量을 測定하므로서 *Chlorella* 細胞에 있어서의 RNA, DNA, 蛋白質, 脂質 等 體物質의 生合成 過程에 미치는 마그네슘의 缺乏 効果를 밝히고저 하였다.

材料 및 方法

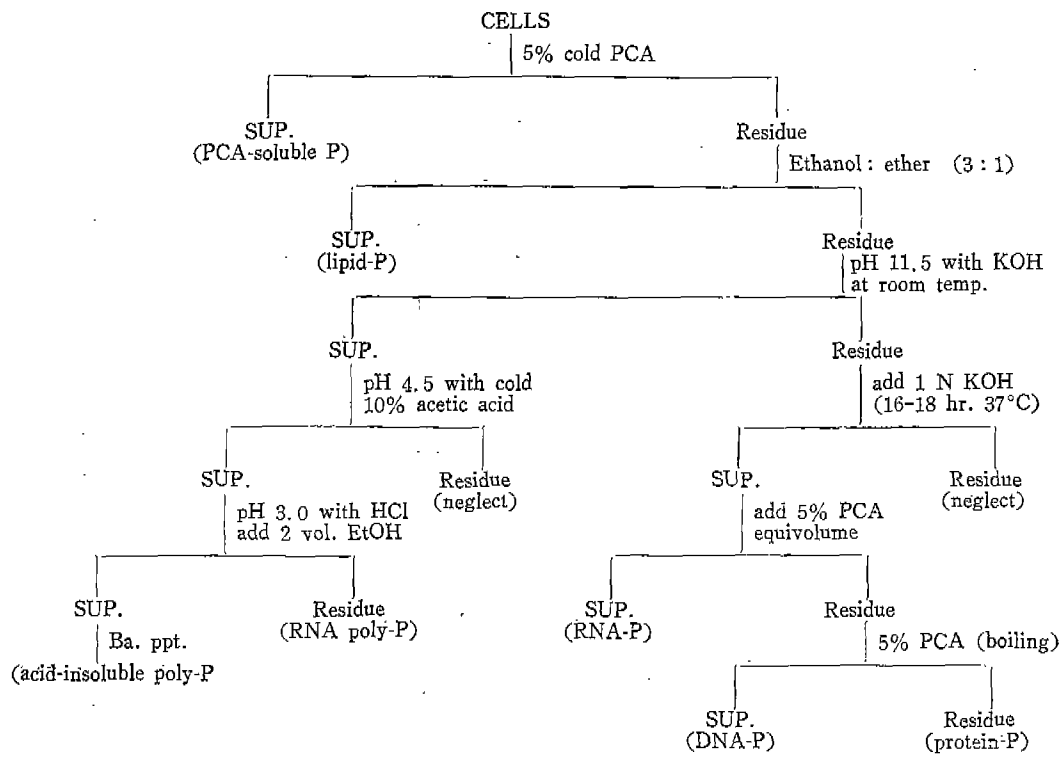
*Chlorella ellipsoidea*를 正常 培地와 마그네슘 缺乏 培地에 接種하여 培養하였다.

培養 期間中 계속해서 CO_2-enriched air로 bubbling시키고 約 7500lux의 照明과 25°C의 温度를 維持하였다.

培養이 一定 時期에 達했을때 細胞를 收穫하여 1/500 M K_2SO_4로 3번 씻은 後 여러가지 構成 成分으로 分劃하였다. 正常 培地의 組成은 *l* 當 5.0 g KNO_3, 2.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.25 g KH_2PO_4, 0.003 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 1ml의 Arnon's A_5 溶液을 含有하는데 마그네슘 缺乏 培地에서는 正常 培地의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$를 K_2SO_4로 代置하였다.

燐酸 化合物의 分劃 操作: 接種時와 培養의 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 Table 1과 같은 順序로 分劃하였다.

Table 1. Fractionation of phosphate compounds in *Chlorella*



核酸의 分離는 Schmidt & Tannhauser 法 (1945)에 의거하였고 포리燐酸의 分離는 Correll & Tolbert (1962)法을 多小 改良 하였는데 細胞의 處理順序는 다음과 같다.

① 5%의 cold PCA (perchloric acid)로 2回 (30分, 15分間), ② hot ethand : ether(3 : 1)로 3回, ③ 冷 KOH로 pH 11.5로 調節하여 2回(60分, 30分) 抽出한 다음, ④ 1N KOH로 37°C에서 16~18時間 處理하여 沈澱物을 除去하고, ⑤ 上澄液을 PCA로 中和한 후, 5% PCA를 加해 2.5% 溶液이 되게 하여, ⑥ 沈澱된 DNA-蛋白은 5% PCA에 懸濁하여 15分間 100°C에서 加熱하여 蛋白質로부터 DNA를 分離하였다.

分 析: 各 分劃區의 燐酸 化合物을 Semimicro Kjeldahl flask 內에서 5 N H_2SO_4로 加水分解시켜 遊離된 無機 燐酸의 量을 Fiske & Subbarow (1925)法으로 測定하였다.

Orthophosphate—Berenblum & Chain(1938)法에 따라 操作①에서 얻은 上澄液에 H_2SO_4(最終濃度 0.1 N)와 Ammonium molybate(最終 濃度=0.0016 M) 및 Isobutanol 3 ml를 加하여 세게 흔든 다음 Isobutanol 層을 取하여 phosphomolybdate의 量을 測定하였다.

Nucleotidic-labile phosphate—Crane and Lipmann(1953)法에 따라 操作①에서 얻은 上澄液에 charcoal을 加하여 0°C에서 30分間 nucleotide를 吸着시킨다음 遠心分離로 charcoal을 分離하고 H_2SO_4(最終濃度 1N)을 加하여 100°C에서 10分間 處理하였다. 冷却시킨 後 標品에 ammonium molybdate(最終濃度 0.016 M)와 isobutanol을 加하여 isobutanol 層의 phosphomolybdate의 量을 測定하였다.

PCA-Soluble total phosphate—操作①에서 얻은 上澄液을 Kjeldahl flask 內에서 5 N H_2SO_4로 加水分解한 後 그 無機 燐酸을 測定하였다.

Phospolipid—操作②에서 얻은 上澄液을 Kjeldahl flask 內에서 酸으로 加水分解시켜 얻은 Orthophosphate의 量을 測定하였다.

RNA -polyphosphate complex—操作③에서 얻은 上澄液을 10% cold acetic acid로 pH 4.5로 하여 0°C에서 1時間 處理한 後 遠心分離로 沈澱物을 除去하고 그 上澄液을 dilute HCl로 pH 3.0으로 한후 2倍 容量의 ethanol을 加하여 形成된 沈澱物을 酸으로 加水分解시켜 無機 燐酸의 量을 測定하였다.

RNA 및 DNA—操作⑤ 및 ⑥에서 얻은 上澄液을 各各 RNA 및 DNA 分劃으로 보고 그들의 燐酸 含量을 測定하였다.

Phosphoprotein—操作⑥에서 얻은 沈澱物을 2% KOH에 溶解시킨 後 Semimicro Kjeldahl flask 內에서 酸으로 加水分解시켜 遊離된 無機 燐酸의 量을 測定하였다.

Acid-insoluble polyphosphate—操作④에서 얻은 上澄液에서 RNA--polyphosphate 複合體의 沈澱物을 除去한 上澄液을 pH 4.0으로 調節한 後 acetate butter (pH 4.0) 및 진한 $Ba(NO_3)_2$ 溶液을 加하여 잘 흔들어서 5°C에서 하룻밤을 放置하고 沈澱物을 遠心分離로 分離하여 1N HCl에 溶解시킨 後 酸으로 加水分解시켜 그 無機 燐酸의 量을 測定하였다.

結 果

마그네슘 缺乏培地에서 培養하는 동안에 일어난 細胞內 各種 燐酸化合物의 量的 變化를 對照區의 그것과 比較한 結果를 Table 2에 表示하였다.

Table 2. Amounts of phosphate in each fractions of chlorella cells. (μM/L. medium)

Fraction	Time of culture (hr.) in a normal medium.					Time of culture (hr.) in a Magnesium-free medium.				
	0	7	15	30	50	0	7	15	30	50
RNA	18.49	20.00	30.25	38.50	37.50	18.49	20.50	22.00	41.25	47.50
DNA	2.00	2.55	2.75	4.32	5.39	2.00	2.44	2.18	3.43	4.54
Protein	0.48	0.79	1.42	1.56	2.21	0.48	0.62	0.97	2.00	1.98
Lipid	10.82	17.22	17.10	20.18	24.82	10.82	10.74	11.55	19.67	32.45
Acid-insoluble poly-P	12.71	10.45	10.80	5.75	5.48	12.71	9.14	9.45	9.57	11.96
RNA-poly-P complex	15.62	20.73	24.69	24.69	32.39	15.62	18.46	21.56	22.50	25.00
Acid-soluble total-P	12.98	17.04	19.05	29.40	28.36	12.98	14.09	15.00	17.05	27.27
Orhto-P	10.12	9.16	9.67	10.09	17.58	10.12	5.49	9.36	10.88	14.18
Nucleotidic-labile P	1.41	2.04	2.40	2.79	3.52	1.41	1.84	1.95	2.17	2.72

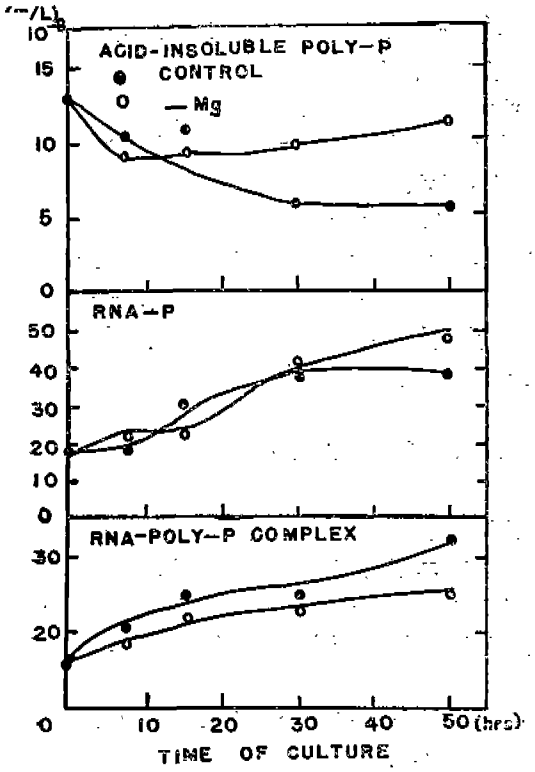


Fig 1. Changes in amounts of phosphate in the lipid, PCA-soluble, and ortho-P fractions of *Chlorella* cells during the culture in a Mg-free medium.

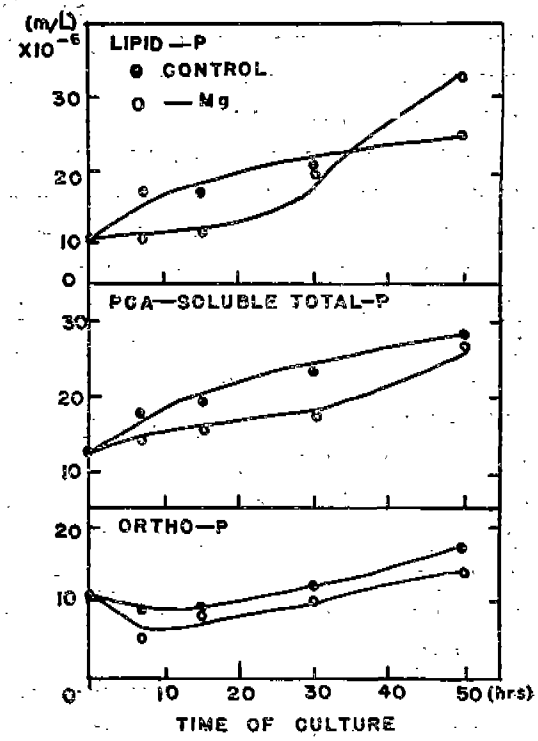


Fig 2. Changes in amounts of phosphate in the acid-insoluble poly-P, RNA, and RNA-poly-P complex fractions of *Chlorella* cells during the culture in a Mg-free medium.

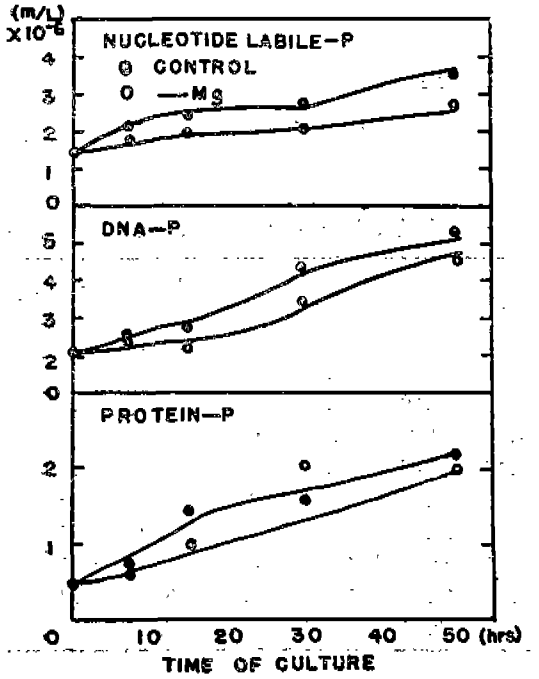


Fig 3. Changes in amounts of phosphate in the nucleotidic-labile P, DNA, and protein fraction of *Chlorella* cells during the culture in a Mg-free medium.

Mg-缺乏培地에서의 細胞容量의 增加는 50時間이 經過한 後에는 對照區에 比해서는 상당히 減少하였으나 接種時의 約 2倍에 達하였다.

培養 過程을 통한 細胞의 脂質 分劃 및 酸可溶性 分劃의 燐酸 含量과 無機 燐酸의 量的 變化를 Fig. 1에 表示하였다.

脂質 分劃의 燐酸 含量은 培養初에는 對照區에 比해 相當히 減少하였으나 接種 後 約 15時間 이후부터는 점차로 증가하여 배양말기에는 對照區보다도 오히려 增加하였다. 酸可溶性 分劃의 全燐酸 含量과 無機燐酸의 量은 全培養過程을 통하여 對照區보다도 낮은 값을 維持하였다.

培養 過程을 통한 酸不溶性 포리燐酸, RNA 및 RNA-polyphosphate complex 分劃의 燐酸 含量의 量的 變化를 Fig. ②에 表示하였다. 培養이 進行됨에 따라 對照區의 酸不溶性 포리燐酸 含量은 현저히 減少되었으나 마그네슘 缺乏區에서는 이러한 減少가 현저하지 아니하였다. 따라서 細胞의 酸不溶性 포리燐酸 含量은 培養時間이 경과함에 따라 對照區보다도 현저히 增加되었다. 한편 RNA 分劃의 燐酸含量은 特히 마그네슘 缺乏區에서 對照區에 비해 減少되는 경향을 찾아 볼 수는 없었으나 RNA-Poly-P complex는 全培養 過程을 통해 낮은 값을 維持하였다.

Fig. 3에는 培養 過程을 통한 酸可溶性 nucleotide 分劃, DNA 分劃 및 protein 分劃에 있어서의 燐酸 含量의 量的變化를 表示하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 酸可溶性 nucleotide 分劃의 燐酸 含量은 對照區의 그것에 比해 全培養過程을 통하여 낮은 값을 推持하였는데 DNA 分劃이나 protein 分劃에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

考 察

光線下에서 正常的으로 자라는 *Chlorella* 細胞의 酸不溶性 포리燐酸의 燐은 蛋白質(Nihei, 1957), DNA(Miyachi and Tamiya, 1961) 및 RNA-포리燐酸 複合體(李, 陳 1966 a; Lee, 1967)등으로 轉換된다고 하는데 本 實驗의 마그네슘 缺乏배지에서의 배양과정에서 세포의 DNA. 蛋白質 및 RNA-포리燐酸 複合體 分劃의 燐酸含量은 對照區에 비해 감소되었으나 酸不溶性 포리燐酸의 含量은 對照區에 비해 오히려 增加되었다. 이것은 酸不溶性 포리燐酸의 燐이 DNA, 蛋白質, RNA-포리燐酸 複合體 등으로 轉換되는 과정이 燐의 缺乏으로 阻害되었기 때문이라고 생각된다. 따라서 마그네슘은 이러한 燐酸基의 이동반응에 역활을 하는 것으로 짐작된다.

Galling(1963)은 *Chlorella pyrenoidosa* 를 마그네슘 缺乏培地에서 同調培養하였을 때 細胞의 DNA 및 蛋白質의 合成能이 低下함을 보고하고 있는데 이는 本實驗에서의 傾向과 대체로 一致된다. 細胞內의 無機 포리燐酸과 RNA-포리燐酸 複合體 相互間의 燐의 轉換이나 이들로부터 다른 細胞構成成分으로의 燐의 轉換은 ADP 를 매개로하여 이루워지는 것으로 생각됨으로(李, 陳, 1966. b)酸不溶性 포리燐酸으로부터 DNA, 蛋白質, 및 RNA-포리燐酸 複合體로의 燐의 轉換과정도 燐酸轉位酵素가 관여하는 反應임에는 틀림 없을 것이다. 마그네슘 이온이 解糖過程에 관여하는 다수의 酵素 特히 燐酸轉位반응에 관여하는 酵素를 活性化한다는 것은 널리 알려져 있는 事實이거니와 마그네슘은 原子團의 移動에 中間運搬體로서 참여하고 特히 酵素-基質 複合體의 형성에 중요한 役割을 하므로 (Nason and McElroy, 1963) 포리燐酸으로부터의 燐酸基의 轉換에도 役割을 하는 것으로 생각할 수 있다.

Aoki & Hase (1964)는 *Chlorella protothecoides* 의 葉綠體 發生 過程에 關한 그들의 實驗에서 細胞의 葉綠素 形成에 앞서 RNA 含量이 增加하고 그 다음 蛋白質 含量이 增加한다고 하였는데 本 研究에서 마그네슘 缺乏區에서는 심한 黃白化와 더부러 蛋白質 含量은 對照區에 비해 현저히 減少되었으나 RNA 減少는 찾아 볼 수 없었다. 마그네슘은 葉綠素의 構成 成分으로서 光合成에 關係하고 있을 뿐만 아니라 炭水化物 代謝에 관여하는 많은 酵素를 活性化하고 原形質內에서 有機物質과 結合된 狀

態로 存在하여 ribosome의 構成分이 되기도 하므로(Bonner, 1965). 마그네슘 缺乏區에 있어서의 黃白化나 蛋白質 含量의 減少는 오히려 당연으것으로 생각된다. RNA含量에 있어서는 현저한 變化가 없었다고는 하나 對照區에 비해 物質代謝가 교란된 흔적을 찾아 볼 수 있었다. 그러나 葉綠素의 形成過程에서 볼 때 마그네슘은 RNA의 合成단계에서가 아니라 蛋白質의 形成 단계에서부터 役割을 하는 것으로 생각할 수 있다.

Lipid-P가 마그네슘 缺乏區의 培養 末期에서는 오히려 增加한것도 마그네슘 缺乏으로 細胞의 物質代謝가 교란된 結果라고 생각된다.

摘 要

*Chlorella*를 마그네슘 缺乏 培地에서 培養하고 培養初와 培養 中間 時期에 一定量의 細胞를 收穫하여 細胞를 分劃하고 여러가지 分劃區에 있어서 燐酸 含量을 測定하여 對照區의 그것과 比較하였다.

1. 마그네슘 缺乏 培地에서 자란 *Chlorella* 細胞의 DNA-P, protein-P, RNA-poly-P complex, nucleotidic-labile P 및 酸可溶性 全燐酸 化合物 含量은 對照區에 비해 減少하였으나 酸不溶性 포리燐酸은 현저히 增加하였다.

2. 따라서 마그네슘은 酸不溶性 포리燐酸에서 DNA-P, protein-P, 및 RNA-포리燐酸 複合體로의 燐의 轉換에 役割을 하는것으로 생각된다.

3. RNA-P와 lipid-P는 培養初에는 오히려 減少되는 경향을 나타내었으나 培養이 進展됨에 따라 對照區보다 약간 增加하는 경향을 나타내었는데 이는 마그네슘의 缺乏으로 物質代謝가 교란된 結果라고 생각된다.

文 獻

1. Aoki, S., & E. Hase (1964) De- and Re- generation of chloroplast in the cells of *Chlorella protothecoides*.
   (1) Synthesis of nucleic acid and protein in relation to the process of regeneration of chloroplast. Plant & Cell Physiol., **5**, 473-484.
2. Berenblum, I., & E. Chain (1938) An improved method for the colorimetric determination of phosphate. Biochem. J., **32**, 295-298.
3. Bonner J. 1965 Ribosomes in "plant Biochemistry" (J. Bonner & Varner J. E eds.)
4. Burdine, H., & Howard, W. (1959) A study of Mg-deficient chlorosis in a certain varieties of green celery. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., **74**, 514-525.
5. Crane, R. K., & F. Lipmann (1953) The effects of arsenate on ascorbic phposphorylation. J. Biol. Chem., **201**, 235-243.
6. Demetriades, S. D., & C. D. Holvas (1958) Mg-deficiency in mulberry. Ann. Inst. phytopath. Benaki., **1**, 330-331.
7. Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**, 375.
8. Galling, G. (1963) Analysis of Mg-deficiency in synchronized *Chlorella*. Arch. Mikrobiol., **46**, 150-184.
9. Lee Y.N. (1967) Incorporation of phosphate into protein and other nitrogenous compounds in *Chlorella* cells. Kor. Jour. Microbiol., **5**, 61-68.