

시금치에서分離한葉綠體의 磷酸代謝에 關한 研究

李鍾三·李永祿
(高麗大學校 理工大學 生物學科)

A Study on Phosphate Metabolism of Chloroplast Isolated from Spinach

Lee, Chong Sam and Young Nok Lee
(Department of Biology, Korea University, Seoul)

ABSTRACT

In order to observe the phosphate metabolism in chloroplast, the contents of inorganic phosphate and various compounds in chloroplast from spinach leaf tissues were investigated during the reaction in the light and dark in the reaction mixture and the turnover of phosphate in chloroplast was compared with that of whole cell system :

1. The phosphorus of DNA in chloroplast appears to be transferred from inorganic phosphate, while in whole cell system from phosphate pool.
2. ^{32}P -phosphate content of acid soluble fraction in chloroplast as well as in whole cell system was more increased in the light than dark during the reaction. It was noted to be caused by the stimulation of sugar phosphate synthesis in the light.
3. It was confirmed that polyphosphate exists in chloroplast as well as whole cell. Acid insoluble polyphosphate content in whole cell system was significantly decreased during the reaction and the similar tendency was also observed in chloroplast. It is, therefore, considered that acid insoluble polyphosphate also play an most important role as a phosphate pool respectively in chloroplast and in cytoplasm.
4. Protein and lipid phosphorus in chloroplast as well as whole cell system were transferred from acid insoluble polyphosphate.

緒 論

지금까지 葉綠體가 다른 세포과립의 도움을 받지 않은 cell free system에서 여러가지 反應을 수행할 수 있다는 증거가 많은 研究者들에 의하여 밝혀졌다.

Eisenstadt와 Bgawarman(1963)은 *Euglena gracilis*에서, App와 Jagendorf(1964)는 시금치에서, Mahtab등(1966)은 브리에서 각각 分離시킨 葉綠體에

서의 蛋白質合成을 報告한 바 있고, Givan과 Stumpt(1971), Nakamura와 Yamada(1975), Yamada와 Nakamura(1975)등은 脂肪의 合成能을 明白히 하였다.

Jensen과 Bassham(1966), Robert등(1970), Krogmann 등(1959), Avron(1960) 및 Arnon 등(1967)은 葉綠體의 光合成能을 究明하였고, Bucke등(1966)은 葉綠體內에서 炭素固定에 끼치는 糖과 sugar phosphate의 効果를 밝혔고, Levi(1975)는 Kalanchoe의 葉綠體

에서의 二酸化炭素 固定을 報告하였다.

Tewari와 Wildman(1967)은 DNA合成을, Schweiger와 Berger(1964) 및 Semal등(1965)은 RNA合成을 밝혔으며, Rose와 Gramm(1975)은 分裂中에 있는 시금치의 葉綠體內에서의 核酸分布를 調査하였으며, Robinson과 Stocking(1968)은 葉綠體에서의 酸素放出과 그들의 膜의 透過性에 關하여 밝혔다.

그러나 Miyachi(1961)가 시금치에서 폴리인산의 存在를 確認한 以來 葉綠體에서의 磷酸代謝 특히 폴리인산의 役割과 다른 磷酸과의 相互作用에 關하여 論議된 바가 거의 없다.

本 研究에서는 시금치에서 分離한 葉綠體를 明處와 暗處에서 각각 反應시키는 동안에 形成되는 여러가지 磷酸化合物의 量的 變化를 폴리인산을 中心으로 調査하여 whole cell system의 그것과 比較함으로써 葉綠體의 磷酸代謝의 特性을 解析코자 하였다.

材料 및 方法

1. 葉綠體의 分離

葉綠體의 分離는 Lyttleton(1962)의 方法을 使用하였는데 그 處理 順序를 Table 1에 表示하였다.

먼저 시금치(*Spinacia oleracea* L.)를 tap water로 세척하고 다시 滅菌된 증류수로 2~3회 세척한 다음 큰 脈을 除去하고 작은 크기로 切斷하였다. 이후의 모든 操作은 2~4°C下에서 行하였다. Edmund Buhler Homogenizer, type hr Nr 1875를 使用하여 0.5M sucrose가 包含된 phosphate buffer(pH 7.5)에서 30초간씩 3~4회 搗碎하였다. 搗碎물은 cheese cloth에 여과하여 whole cell과 組織들을 除去한 다음 150xg에서 5分間 遠心하였다. 沈澱物을 0.5M sucrose 溶液에 懸탁하였다.

200xg에서 10分間 다시 遠心하여 얻어진 沈澱物을 0.5M sucrose에 懸탁하여 다음 實驗에 使用하였다. 核의 오염은 Feulgen 反應으로 確認하였다.

2. 細胞 懸탁액 製

前 操作은 葉綠體 分離와 同一하였다. 일을 30초간씩 1~2회 搗碎하였다. 搗碎물을 cheese cloth에 여과하여 1,000xg에서 10分間 遠心하였다. 沈澱物을 0.5M sucrose溶液에 懸탁하여 다음 實驗에 使用하였다.

3. 反 應

分離한 葉綠體와 whole cell을 反應液(0.5M sucrose, 50mM glucose, 0.2μM alanine, 100mM KH_2PO_4 , 0.39mCi/L³²P-phosphate)을 使用하여 25°C 恒溫水槽에서 明處와 暗處下에 각각 5時間씩 反應시켰다.

4. 磷酸化合物의 分離

反應期間中 一定量의 葉綠體와 whole cell을 수확하여 Table 2와 같은 順序로 分離하였다. 核酸의 分離는 Schmidt 와 Tannhauser(1945) 方法에 의거하였고, 폴리인산의 分離는 Miyachi 와 Tamiya(1961)의 方法을 使用하였는데 그 處理順序는 다음과 같다.

(I) 5% PCA로 2回(30分, 15分),

(II) 95%와 75% ethanol로 각각 1回,

(III) Hot ethanol: ether(3:1)로 3回~4回,

(IV) Cold(10%) KOH로 pH 9로 調節하여 2回(1時間, 30分) 抽出한 후,

(V) 0.5N KOH로 37°C에서 16~18時間 處理하여 沈澱物을 除去하고,

(VI) 上澄液에 5% PCA를 加하여 2.5% 溶液이 되게 하여,

(VII) 沈澱된 DNA蛋白을 5% PCA에 懸탁하여 15分間 100°C에서 加熱하여 蛋白質을 沈澱시켰다.

5. 分 析

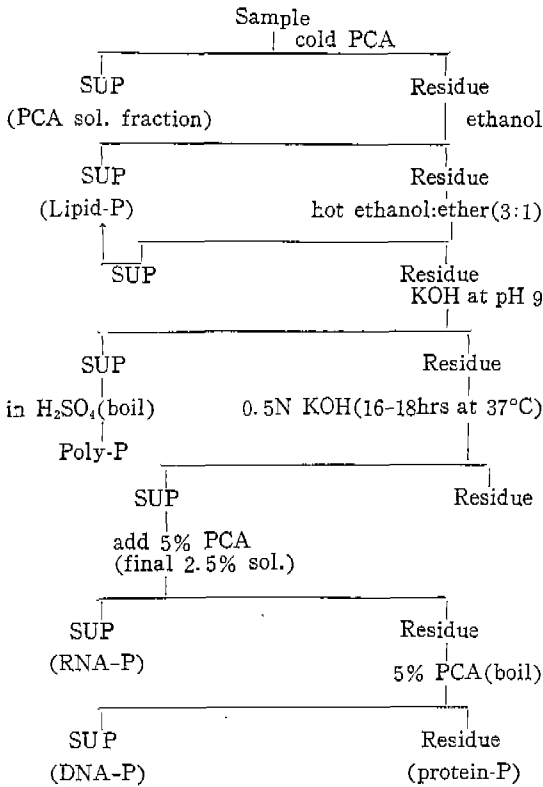
각 fraction의 ³²P의 量은 그들의 放射能을 測定하여 反應液의 ³²P의 比放射能으로 부터 算出하였고 그들의 放射能은 Scintillation Counter, Nuclear Chicago, Model 181B로 측정하였다.

Total-P의 量은 각 fraction의 磷酸化合物을 Kjeldahl flask內에서 H₂SO₄로 加水分解시켜 얻어진 無機 磷酸의 量을 Fiske and Subbarow(1925) 方法으로 測定하였다.

Table 1. Method of isolation of chloroplast from spinach leaves

Spinach leaves	Wash with tap water and sterilized dist. water.
	Remove midrib.
Leaves	Homogenize in phosphate buffer(pH 7.5) containing 0.5M sucrose sol.
Homogenate	Filter through cheese cloth
Filterate	Centrifuge 150xg 5 min.
Precipitate	Resuspend in 0.5M sucrose sol. Centrifuge 200xg 10min.
	Precipitate(whole chloroplast pellet)

Table 2. Fractionation of phosphate compounds in chloroplasts isolated from spinach leaves and cells



Ortho phosphate; Berenblum 과 Chain(1938)의 방법에 따라 操作 I에서 얻은 上澄液에 H₂SO₄(最終濃度 0.1N)와 ammonium molybdate(最終濃度 0.0016 M) 및 isobutanol 3ml을 加하여 세게 혼든 다음 isobutanol層을 取하여 그 放射能을 測定하였다.

Nucleotidic labile phosphate; Crane 과 Lipmann (1953)의 방법에 따라 操作 I에서 얻은 上澄液에 charcoal을 加하여 잘 혼들어서 0°C에서 30分間 吸着시킨 다음 遠心分離하여 charcoal을 分離하고 H₂SO₄(最終濃度 1N)을 加하여 100°C에서 10分間 處理하였다. 冷却시킨 후 標品에 ammonium molybdate(最終濃度 0.016M)와 isobutanol을 加하여 isobutanol層의 放射能과 phosphomolybdate의 量을 測定하였다.

Acid soluble polyphosphate; Miyachi 와 Tamiya (1961)의 방법에 따라 操作 I에서 얻은 上澄液을 pH 4.0으로 調節한 후 acetate buffer(pH 4.0) 및 진한 Ba(NO₃)₂ 溶液을 加하여 잘 혼들어서 5°C에서 하루 밤을 維持하고 形成된 沈澱物을 遠心分離하여 1N HCl 에 溶解시킨 다음 그 放射能을 測定하였다.

Acid insoluble polyphosphate; Miyachi 와 Tamiya(1961)의 方法에 따라 操作 IV에서 얻은 上澄液에 H₂SO₄(最終濃度 1N)을 加하여 10分間 비등시켜 加水分解된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

Phospholipid; 操作 II와 操作 III에서 얻은 上澄液을 lipid fraction으로 보고 그 少量을 取하여 semi-micro Kjeldahl flask 內에서 H₂SO₄로 加水分解시켜 얻은 無機磷酸의 量을 測定하였다.

RNA 및 DNA; 操作 VI와 操作 VII에서 얻은 上澄液을 각각 RNA와 DNA fraction으로 보고 그들의 無機磷酸의 量을 測定하였다.

또한 이들의 紫外部 吸收度를 DU-spectrophotometer 로 測定하여 그 값을 比較하였다.

Protein; 操作 VII에서 얻은 沈澱物을 0.5N KOH로 溶解시킨 후 semi-micro Kjeldahl flask 內에서 H₂SO₄로 加水分解시켜 얻어진 無機磷酸의 量을 測定하였다.

6. 蛋白質 및 炭水化物的 分析

Table 2에서 나타난 바와 같이 操作(I)에서 얻은 上澄液을 유리 아미노산, 操作 VI에서 얻은 상동액을 alkali labile protein, 操作 VII에서 얻은 沈澱物을 alkali stable protein으로 보고 ninhydrin反應(Troll and Cannon, 1953)을 利用하여 各 分割의 蛋白質을 定量하였다.

操作(I)에서 얻은 酸可溶性分割, 操作(II)와 (III)에서 얻은 脂溶性分割, 操作(V)에서 얻은 알칼리不溶性分割에 含有된 炭水化物은 anthrone method(Scott and Melvin, 1953)로 定量하였다.

結 果

反應中 일어난 葉綠體와 whole cell system의 各種 磷酸化合物의 ³²P 및 total-P의 含量 그리고 紫外部 吸收值의 變化를 Table 3과 4에 表示하였다

1. 酸可溶性 磷酸化合物의 含量 變化

葉綠體에서 反應期間동안 일어난 酸可溶性分割, 酸可溶性 폴리인산, ortho-P分割, nucleotidic labile-P 分割의 ³²P 및 total-P의 含量과 酸可溶性分割의 紫外部 吸收值의 變化를 Fig. 1과 Fig. 2에서 表示하였다. Fig. 1과 Fig. 2에 表示된 바와 같이 葉綠體에서 酸可溶性分割의 ³²P의 含量은 反應期間동안 光線下에서는 暗處에서 보다 현저히 增加하였다. 酸可溶性 폴리인산의 ³²P와 total-P의 含量은 완만한 增加를 나타내었고 暗處에 비해 光線下에서 약간 增加하였다. Ortho-P 分割의 total-P는 暗處에 비해 明處에서 현저하게 增加하였고 ³²P는 현저하지 못하였다.

Nucleotidic labile-P 分割의 total-P는 反應初 부터

Table 3. Amounts of ^{32}P and total-P in each fraction of chloroplast isolated from spinach leaf cells during the reaction under the light and dark

Sample	Duration of reaction (hr)	^{32}P -phosphate ($\mu\text{mole/ml chl}$)		Total-P ($\mu\text{mole/ml chl}$)		UV-absorbancy at 260m μ	
		Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
PCA sol. total-P	0			20.16	20.16	0.09	0.09
	0.5	11.76	7.26	25.87	21.19	0.10	0.09
	1	14.56	7.40	26.69	22.60	0.12	0.11
	2	18.16	7.30	43.44	40.53	0.16	0.11
	5	20.05	11.75	46.78	44.41	0.21	0.14
Ortho-P	0			0.13	0.13		
	0.5	0.11	0.10	9.15	2.84		
	1	0.18	0.11	10.22	5.95		
	2	0.24	0.10	10.67	8.31		
	5	0.19	0.18	23.93	10.56		
Acid soluble nucleotidic labile-P	0			0.79	0.79		
	0.5	0.57	0.56	0.83	0.77		
	1	0.75	0.57	0.96	0.84		
	2	0.94	0.56	1.15	0.94		
Acid soluble poly-P	0			1.43	1.43		
	0.5	0.23	0.25	1.68	1.43		
	1	0.35	0.25	1.82	1.57		
	2	0.39	0.28	2.01	1.66		
Sugar-P	0			2.05	2.02		
	0.5	10.85	6.35	17.81	17.81		
	1	13.28	6.46	14.21	16.15		
	2	16.59	6.36	13.69	14.24		
Lipid-P	0			29.61	29.62		
	0.5	18.41	10.14	19.34	30.64		
	1			15.57	15.57		
	0.5	0.78	0.46	18.25	15.39		
Acid insoluble poly-P	0			20.08	15.82		
	0.5	0.19	0.41	21.94	17.57		
	1	1.23	0.46	21.94	17.57		
	2	1.65	0.79	23.87	17.81		
RNA	0			2.04	2.04		
	0.5	0.22	0.28	1.64	1.50		
	1	0.29	0.25	1.21	1.01		
	2	0.19	0.12	1.04	0.67		
DNA	0			0.67	0.55		
	0.5	1.59	1.71	16.49	16.49	0.16	0.16
	1	2.24	1.69	17.43	16.74	0.18	0.18
	2	2.32	1.71	18.58	17.79	0.23	0.23
Protein	0			23.12	19.17	0.33	0.29
	0.5	2.73	2.56	28.05	21.87	0.44	0.35
	1	0.10	0.11	0.52	0.52	0.13	0.13
	0.5	0.15	0.12	0.49	0.47	0.13	0.12
Protein	1	0.23	0.18	0.54	0.49	0.14	0.13
	2	0.27	0.34	0.60	0.54	0.16	0.14
	5	0.07	0.04	0.67	0.62	0.17	0.16
	5	0.09	0.07	0.87	0.78		

Table 4. Amounts of ^{32}P and total-P in each fraction of spinach cells during the reaction under the light and dark

Sample	Duration of reaction (hr)	^{32}P -phosphate (μ mole/ml cells)		Total-P (μ mole/ml cells)		UV-absorbancy at 260m μ	
		Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
PCA sol. total-P	0			32.82	32.82	0.29	0.29
	0.5	16.22	11.05	45.58	24.89	0.32	0.30
	1	22.19	21.20	52.94	48.29	0.34	0.32
	2	27.16	20.37	56.00	52.89	0.35	0.33
	5	39.06	26.04	63.50	63.95	0.45	0.34
Ortho-P	0			11.68	11.68		
	0.5	6.49	2.41	15.93	14.35		
	1	11.89	6.92	18.88	15.25		
	2	13.59	6.89	20.64	16.01		
	5	16.21	7.89	20.91	18.05		
Acid soluble nucleotidic labile-P	0			2.84	2.84		
	0.5	0.36	0.21	3.78	3.25		
	1	0.76	0.43	4.49	3.39		
	2	0.89	0.59	5.53	3.61		
Acid soluble poly-P	0			0.70	0.70		
	0.5	0.41	0.24	3.65	0.77		
	1	0.44	0.32	4.92	1.42		
	2	0.53	0.33	5.53	1.65		
Sugar-P	0			5.91	2.10		
	0.5	8.96	8.19	17.60	17.60		
	1	9.13	13.53	22.22	6.52		
	2	12.15	12.56	24.65	28.23		
Lipid-P	0			24.30	31.62		
	0.5	20.87	16.93	24.30	31.62		
	1			33.63	38.34		
	2			33.63	38.34		
Acid insoluble poly-P	0			19.04	19.04		
	0.5	2.41	1.55	24.08	19.88		
	1	2.81	2.01	29.19	27.76		
	2	2.92	2.22	29.19	27.76		
RNA	0			35.15	30.65		
	0.5	3.91	2.94	44.19	37.82		
	1			44.19	37.82		
	2			44.19	37.82		
DNA	0			11.53	11.56		
	0.5	0.46	0.25	10.69	9.37		
	1	0.39	0.22	7.35	6.10		
	2	0.29	0.12	3.16	2.87		
Protein	0			3.23	2.88		
	0.5	0.25	0.14	28.27	23.27	0.40	0.40
	1	1.68	1.06	32.17	30.38	0.45	0.44
	2	2.09	1.39	34.18	32.85	0.45	0.43
Protein	0			36.92	32.89	0.46	0.47
	0.5	3.26	1.65	36.92	32.89	0.46	0.47
	1	3.37	2.23	37.31	35.57	0.62	0.48
	2			37.31	35.57	0.62	0.48
Protein	0			2.62	2.62	0.18	0.18
	0.5	0.19	0.10	2.85	2.73	0.22	0.18
	1	0.24	0.17	3.18	3.04	0.24	0.22
	2	0.23	0.15	3.14	3.19	0.23	0.22
Protein	0			3.23	3.21	0.24	0.23
	0.5	0.31	0.21	3.23	3.21	0.24	0.23
	1			4.43	4.48		
	2			4.43	4.48		
Protein	0			7.26	6.77		
	0.5	0.05	0.03	7.26	6.77		
	1	0.06	0.04	7.32	6.85		
	2	0.06	0.04	7.42	7.53		
Protein	0			7.86	7.42		
	0.5	0.08	0.05	7.86	7.42		

완전한 증가를 보였으며 특히 反應期間 동안 暗處보다 明處에서 增加하였다. ^{32}P 의 含量은 光線下에서는 反應 2時間만에 거의 平衡상태에 도달하였으며 暗處에서는 완전히 증가하였다.

反應期間동안 whole cell system에 있어서 酸可溶性 磷酸化合物, 酸可溶性 폴리인산, ortho-P, nucleotidic labile-P의 含量과 酸可溶性 分割의 紫外部 吸收值의 變化는 Fig. 3 및 4와 같다.

Whole cell system에서 酸可溶性 分割의 ^{32}P 의 含量은 反應期間동안 暗處에 비해 光線下에서 현저히 增加하였고 total-P의 含量은 反應 初期부터 增加하였다.

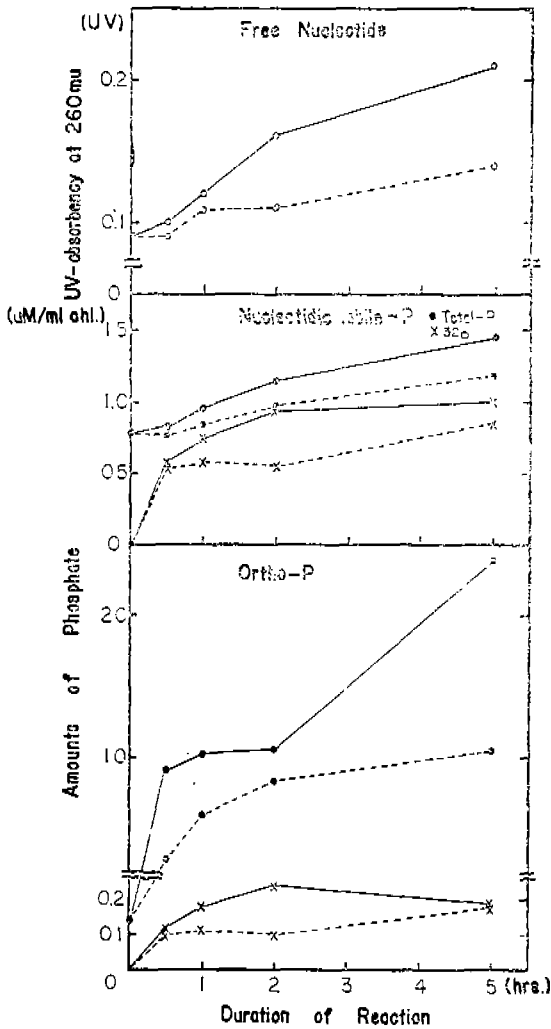


Fig. 1. Changes in amounts of ^{32}P and total-P in the fraction of ortho-P and nucleotidic labile-P, and amount of UV-absorbing materials in the acid soluble fraction of chloroplast isolated from spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

酸可溶性 폴리인산의 total-P 및 ^{32}P 의 含量은 反應 期間동안 暗處에 비해 光線下에서 현저하게 增加하였다. Ortho-P 分割의 total-P는 反應期間동안 暗處에 비해 明處에서 增加하였으며, 이러한 增加率은 ^{32}P 에서 현저하였다. Nucleotidic labile-P에 있어서 total-P는 反應期間동안 暗處에 비해 光線下에서 더욱 현저하였으며, 이러한 增加는 ^{32}P 의 含量에서도 비슷한 경향을 보여주었다.

2. 酸不溶性 폴리인산의 含量 變化

反應 期間동안 分離한 葉綠體와 whole cell system의 酸不溶性 폴리인산의 含量 變化를 Fig. 5에 表示하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 whole cell system과 마찬가지로 分離한 葉綠體에서도 酸不溶性 폴리인산의 ^{32}P 및 total-P의 含量은 反應期間동안 현저히 減少하였다.

3. 蛋白質 含量의 變化

分離한 葉綠體의 磷蛋白, 遊離아미노산, alkali-labile protein, alkali-stable protein 및 total protein

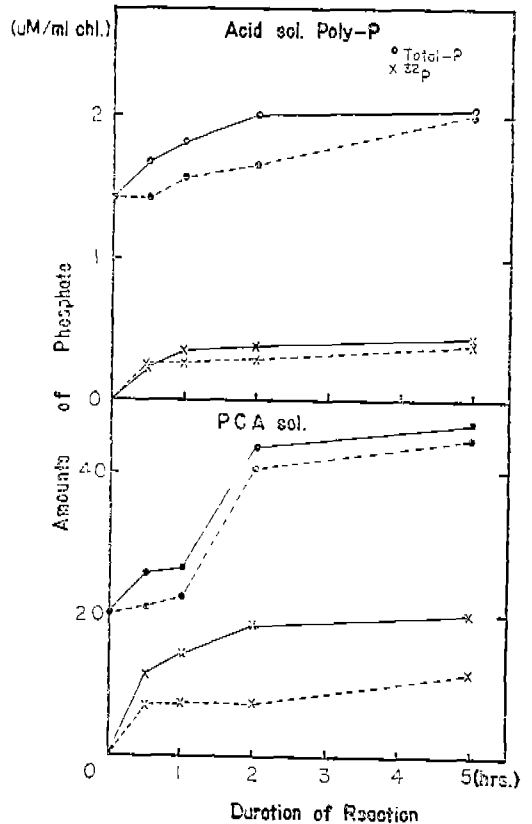


Fig. 2. Changes in amounts of ^{32}P and total-P in the acid soluble fraction and acid soluble polyphosphate fraction of chloroplast isolated from spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

의 含量變化를 Fig. 6에 表示하였다. Fig. 6에서 볼 수 있는 바와 같이 磷蛋白의 total-P 및 ^{32}P 의 含量은 反應期間 동안 暗處에 비해 光線下에서 反應시킨 것이 약간 增加를 나타내었다.

葉綠體의 alkali-stable protein의 含量은 暗處에 비해 明處에서 현저히 增加하였으나 遊離 아미노酸과 alkali-labile protein 含量에는 큰 差異가 없었다.

Whole cell system에 있어서 磷蛋白, 遊離아미노酸, alkali-labile protein, alkali-stable protein 및 total protein의 含量 變化를 Fig. 7에 表示하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 細胞質의 蛋白質分劃의 total-P의 含量은 明處에서와 마찬가지로 暗處에서도 初期에 현저히 增加하였으며, 특히 暗處에 비해 光線下에서 현저한 增加를 나타내었으나 ^{32}P 의 含量變化는 현저하지 못하였고, alkali-labile protein과 alkali-stable protein의 含量도 이와 비슷한 傾向을 나타내었다.

4. DNA含量的 變化

分離한 葉綠體와 whole cell system의 DNA분획의 total-P, ^{32}P 및 紫外部 吸收物質의 含量 變化를 Fig. 8에 表示하였다.

Fig. 8에서 볼 수 있는 바와 같이 葉綠體의 DNA分劃의 紫外部 吸收値와 total-P는 明處에서나 마찬가지로 反應期間 동안 약간 增加하였고, 특히 ^{32}P 의 含量의 增加는 total-P의 增加率에 비해 현저하였다. 그러나 whole cell system에서는 total-P의 增加가 ^{32}P 의 增加에 비해 더욱 현저하였다.

5. RNA含量的 變化

分離한 葉綠體와 whole cell system에 있어서 total-P, ^{32}P 의 含量 및 紫外部 吸收値의 變化를 Fig. 9에 表示하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 葉綠體의 紫外部 吸收値와 total-P의 含量은 反應期間 동안 暗處에 비해 光線下에서 增加하였는데 이러한 傾向은 細胞質에서는 더욱 현저하였다.

6. Lipid-P의 含量 變化

分離한 葉綠體와 whole cell system에서의 lipid-P分劃의 total-P와 ^{32}P 의 含量 變化를 Fig. 10에 表示하였다. Fig. 10에 表示된 바와 같이 葉綠體에 있어서는 lipid-P分劃의 total-P 및 ^{32}P 의 增加는 反應期間 동안 계속되었으며 暗處에 비해 明處에서 增加率이 높았다. 이러한 增加率은 whole cell system에서는 葉綠體에서 보다는 현저히 증가하였다. 특히 分離한 葉綠體의 ^{32}P 의 含量은 暗處에 비해 光線下에서는 더욱 현저히 增加하였다.

7. 炭水化物的 含量 變化

分離한 葉綠體의 酸可溶性 分劃, 脂溶性 分劃 및 알칼리 不溶性 分劃에 있어서의 炭水化物的 含量 變化를 Fig. 11에 表示하였다.

Fig. 11에서 볼 수 있는 바와 같이 葉綠體의 脂溶性 分劃에 含有된 炭水化物的 含量은 反應期間 동안 暗處에 비해 光線下에서 더욱 현저한 增加를 나타내었으나 酸可溶性 分劃과 알칼리 不溶性 分劃에 含有된 炭水化物的 含量에는 明暗에 따라 큰 差異를 찾아볼 수 없었다.

Fig. 12는 whole cell system에 있어서 酸可溶性 分劃, 脂溶性 分劃, 알칼리 不溶性 分劃의 炭水化物的

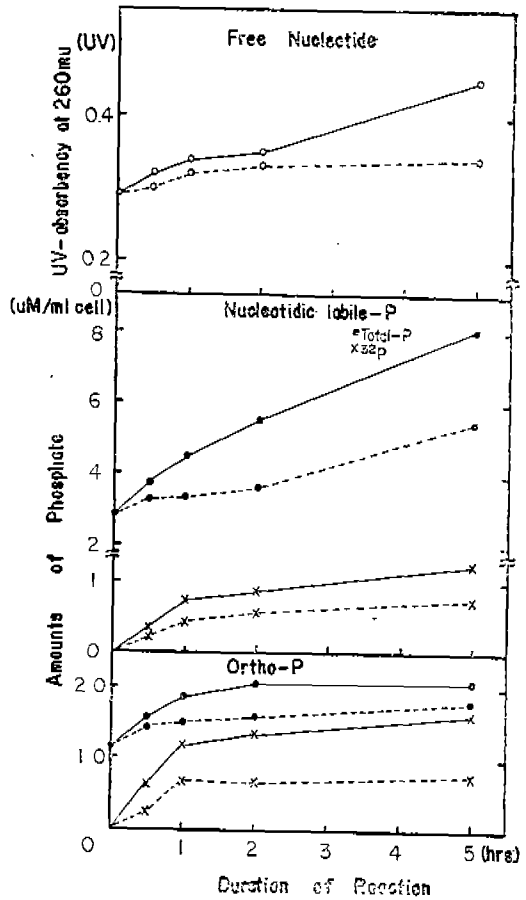


Fig. 3. Changes in amounts of ^{32}P and total-P in the fraction of ortho-P and nucleotidic labile-P, and amount of UV-absorbing materials in the acid soluble fraction of spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light —, dark.....

含量 變化를 表示한 것이다.

Whole cell system에서도 total carbohydrate含量은 暗處에 비해 明處에서 反應初期에 현저히 증가하였는데, 이는 脂溶性分劃과 알칼리 不溶性 分劃에서의 炭水化合物 含量의 增加에 基因한 것이다.

考 察

分離한 葉綠體에서의 酸可溶性 分劃의 ^{32}P 含量은 反應期間 동안 光線下에서 反應시킨 것이 暗處에서 보다 增加하였는데 이는 주로 ^{32}P 의 sugar phosphate로의 轉換이 光線下에서 더욱 촉진되었기 때문이며 whole cell system에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었다.

특히 whole cell system에 있어서 ortho-P 分劃의 ^{32}P 는 total-P의 含量에 비해 현저히 증가하였으며 分離한 葉綠體에서는 ortho-P分劃의 ^{32}P 는 현저한 增加를 하지 않았으나 total-P의 含量은 현저히 증가하였다. 光線下에서 sugar phosphate含量의 增加로 보아 磷酸의 吸收는 光線의 조사에 의하여 촉진되어 葉綠體에서는 光線下에서 신속히 磷酸이 sugar phosphate로 轉換되는 것으로 짐작된다.

Wintermans(1955)는 *Chlorella vulgaris*細胞가 光線下에서 orthophosphate를 폴리인산으로 轉換시키는 것을 觀察하였고, Nihei(1955, 1957)는 *Chlorella ellipsoidea*의 同調培養中 폴리인산은 D-cell과 L-cell間에서 가장 활발하게 合成된다고 하였으며, Miyachi(1961)는 시금치 잎에서 폴리인산의 存在를 確認하였으며, 李(1964) 및 李·陳(1966)등은 *C. ellipsoidea*에서 폴리인산의 存在와 그들의 phosphate pool로서의 役割을 밝힌바 있으며, Gezelius(1974)는 *Dictyostelium discoidium*에서 폴리인산의 存在를 報告한바 있다. 그러나 폴리인산의 細胞內 存在위치에 대해서는 아무런 報告가 없던바 本研究에서는 細胞에서 分離한 葉綠體에도 폴리인산이 存在함을 確認하였다.

分離한 葉綠體의 酸可溶性 폴리인산의 含量도 反應期間동안 暗處에서 보다 光合成時에 약간 增加하였는데 이러한 경향은 whole cell system에서 더욱 현저하였다. 이러한 결과는 無機磷酸으로부터 폴리인산이 形成되는데 이에 關係하는 효소의 活性은 光線의 조사에 의하여 增加하였기 때문이라고 생각된다(Nesmeyanova, et al. 1974).

Whole cell system에서의 酸可溶性 폴리인산 含量이 反應期間동안 현저히 減少하였는데 이러한 경향은 分離한 葉綠體에서도 찾아볼 수 있었다. 따라서 酸不溶性 폴리인산은 細胞質에서나 마찬가지로 葉綠體에 있어서도 phosphate pool의 役割을 하는 것으로 짐작

된다.

Nihei(1957), Miyachi와 Tamiya(1961. a,b), 李(1967) 등은 *Chlorella*細胞에 있어서의 DNA와 蛋白質은 細胞內的 phosphate pool인 酸不溶性 폴리인산에서 磷酸의 轉換이 일어난다고 하였다. 分離한 葉綠體에서 DNA分劃의 total-P의 增加는 ^{32}P 의 增加에 기인하는 것이었으나 whole cell system에서는 ^{32}P 의 增加에 비해 total-P의 增加는 그 絕對量이 현저히 증가함으로 보아, 核의 DNA合成에 必要한 磷酸은 細胞內的 phosphate pool에서 形成되거나 分離한 葉綠體에 있어서는 細胞質에서 吸收한 無機磷酸으로부터 形成되

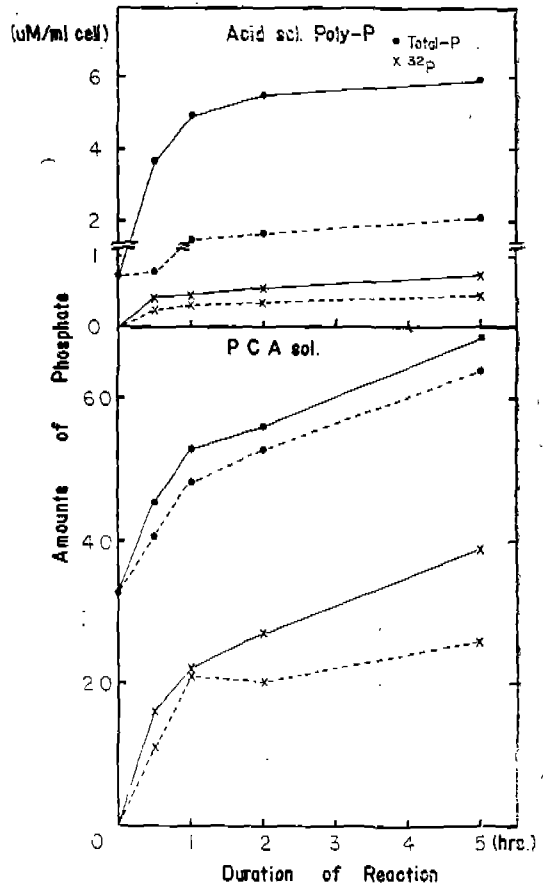


Fig. 4. Changes in amounts of ^{32}P and total-P in the acid soluble fraction and acid soluble polyphosphate fraction of spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

는 것으로 생각된다.

Bove와 Raacke(1959)는 시금치 細胞의 葉綠體內에 는 아미노산을 活性化 시킬 수 있는 효소가 있다고 하였으며 Sissakian(1958)은 葉綠體 自體가 蛋白質을 合成할 수 있는 能力을 가지고 있다고 報告하였고 더욱 最近 Kirk와 Leech(1972), Magalhaes(1974)는 cell free system에서 葉綠體에 nitrate와 pyruvate 또는 oxaloacetate를 導入시켜 주면 自律的으로 아미노산을 合成할 수 있다고 하였다.

Kirk와 Leech(1972) 및 Magalhaes(1974)는 光合成時에 아미노산에 關여하는 효소가 暗處에서 보다 더욱 活性이 높아 아미노산은 光合成時에 더욱 効率的으로 合成되어 蛋白質 合成이 더욱 촉진된다고 하였다.

本 研究에서는 whole cell system과 마찬가지로 分離된 葉綠體에서도 反應期間 동안 明處에서 反應시킨 것이 暗處에서 보다 蛋白質 合成이 촉진된 것은 Kirk와 Leech(1972)와 Magalhaes(1974)의 見解와 一致된다.

分離한 葉綠體에 있어서의 蛋白質 分割의 total-P 및 ^{32}P 의 증가율은 whole cell system과 마찬가지로 현저히 증가하였고, 또한 酸不溶性 폴리인산의 減少로 보아 磷蛋白의 核酸은 細胞質에 있어서나 마찬가지로 分離한 葉綠體에 있어서도 酸不溶性 폴리인산으로부터 轉換된 것으로 생각된다(李·陳, 1966). 특히 分離된 葉綠體와 比較하여 whole cell system에서 磷蛋白이 蛋白質 合成보다 初期에 形成된 것은 酸不溶性 폴리인

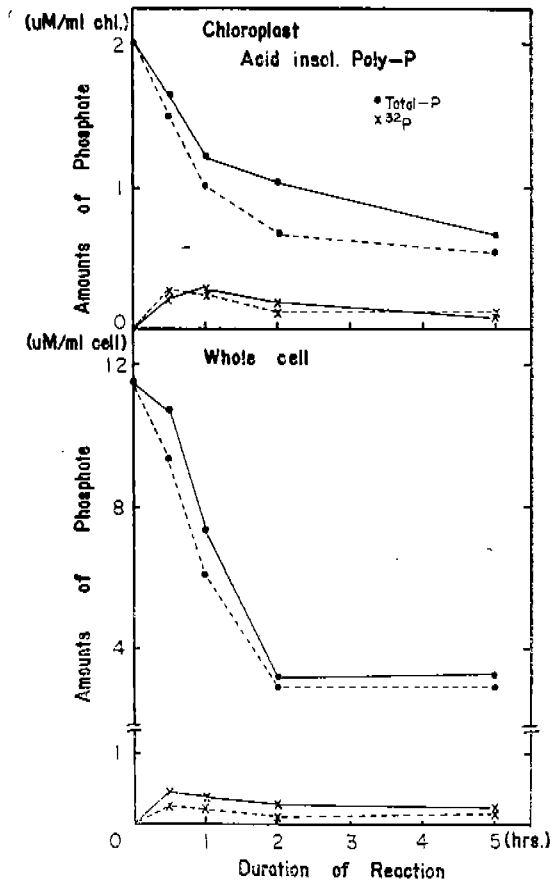


Fig. 5. Changes in amounts of ^{32}P and total-P in the acid insoluble polyphosphate fraction of chloroplast isolated from spinach leaf and spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

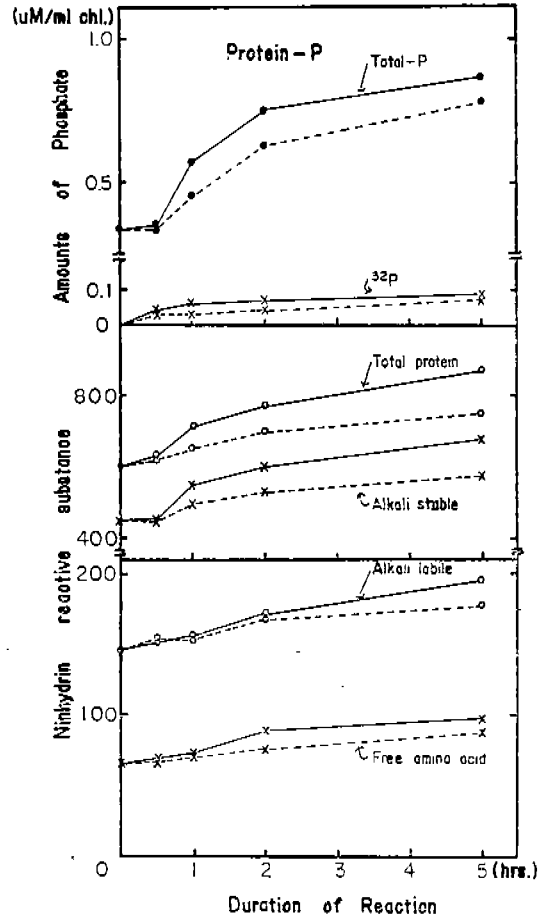


Fig. 6. Changes in amounts of ninhydrin reactive substance in each fraction and ^{32}P and total-P in phosphoprotein of chloroplast isolated from spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

산으로부터 磷酸의 轉換이 급속히 일어났기 때문이다.

Miyachi와 Tamiya(1961 a) 및 Lee(1968)등은 *Chlorella*細胞에 있어서 RNA形成에 使用되는 磷酸은 細胞밖의 磷酸源에서 부터 取한다고 하였다. Whole cell system과 마찬가지로 分離한 葉綠體에서도 ^{32}P 의 增加로 보아 RNA形成에 관여하는 磷酸은 細胞밖에 있는 無機磷酸으로부터 轉換된다고 생각된다.

Winder와 Denny(1956), Belozersky와 Kulaev

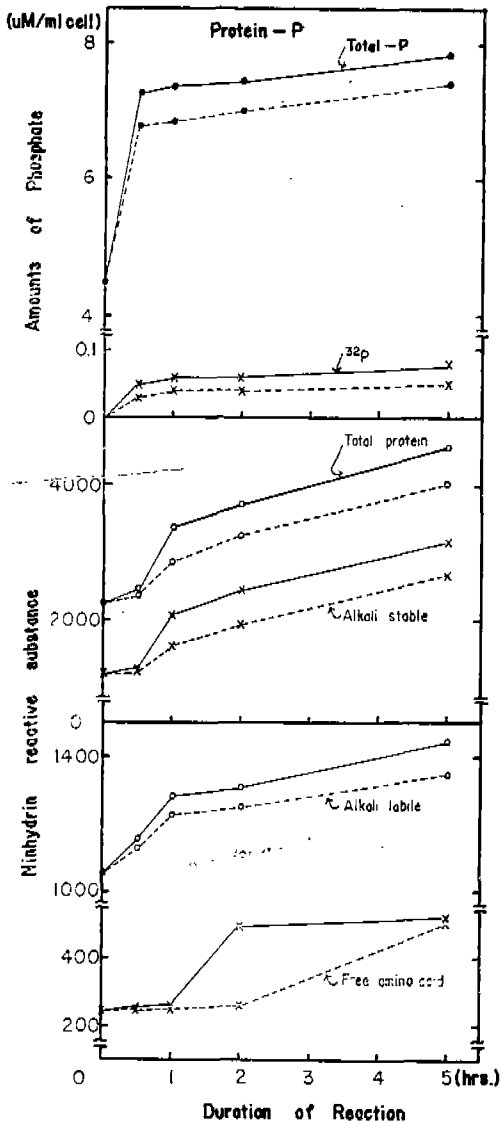


Fig. 7. Changes in amounts of ninhydrin reactive substance in each fraction and ^{32}P and total-P in phosphoprotein of spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light —, dark.....

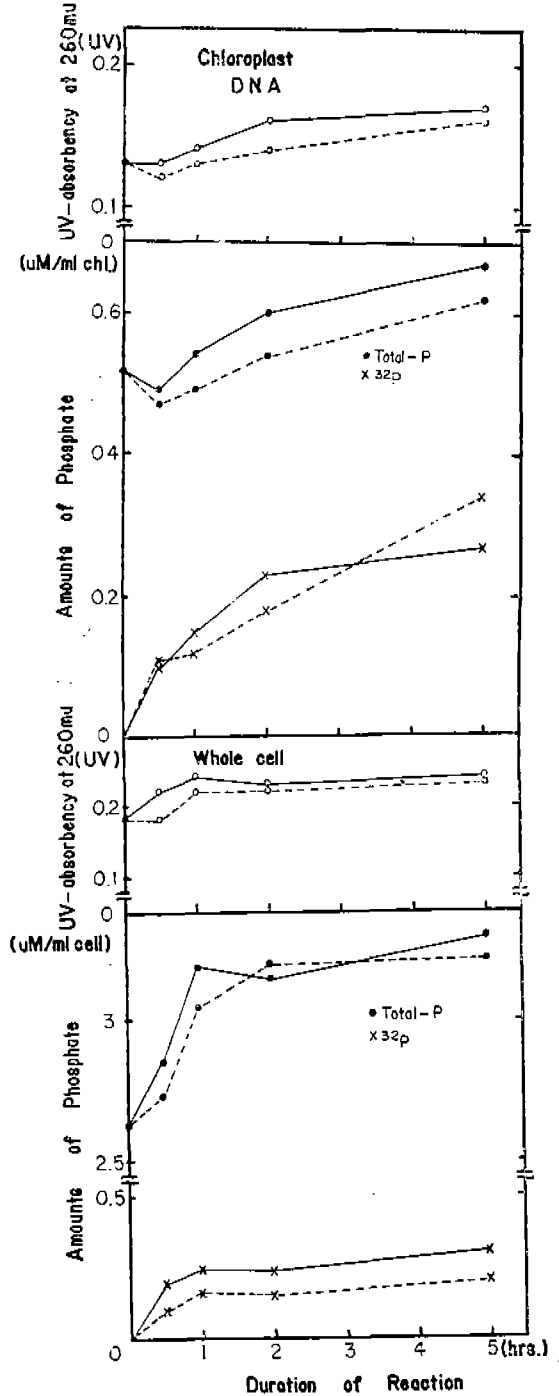


Fig. 8. Changes in amounts of ^{32}P , total-P and UV-absorbing material in DNA fraction of chloroplast isolated from spinach leaf and spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light —, dark.....

(1957), Kulaev와 Belozersky(1957), Zaitseva(1960) 등 共同 研究者들은 *Mycobacteria*, *Aspergillus*와 *Azotobacter*에서 RNA-폴리인산 복합체를 RNA 분획에서 分離하였으며, Correl과 Tolbert(1962, '64, '65) 등은 *Chlorella*에서 RNA-폴리인산 복합체를 分離하였다. 分離된 RNA-폴리인산 복합체는 細胞內 酸不溶性 폴리인산에서 부터 磷酸의 轉換으로 形成되며 (Lee,

1967), 直接 또는 間接으로 DNA 및 蛋白質의 形成에 參與한다(李·陳, 1966; 李 등, 1968).

高等植物인 시금치에서는 아직 RNA 분획에서 RNA-폴리인산 복합체가 分離된 바가 없으나 本 研究에서 酸不溶性 폴리인산이 減少한 것으로 보아 whole cell system에서나 마찬가지로 分離한 葉綠體에 있어서도 RNA-폴리인산의 存在與否에 관계없이 적어도 酸不溶性 폴리인산이 시금치의 細胞質이나 葉綠體에서 phosphate의 reserve material이며 phosphate pool의 役割을 하는 것으로 짐작된다. 시금치 細胞內에서 RNA-폴리인산 복합체의 存在는 앞으로 研究하여 確認하고자 한다.

反應期間동안 暗處에 비해 光線을 調査할 때의 RNA의 含量增加는 Matsuda (1974)가 *Chlamydomonas*

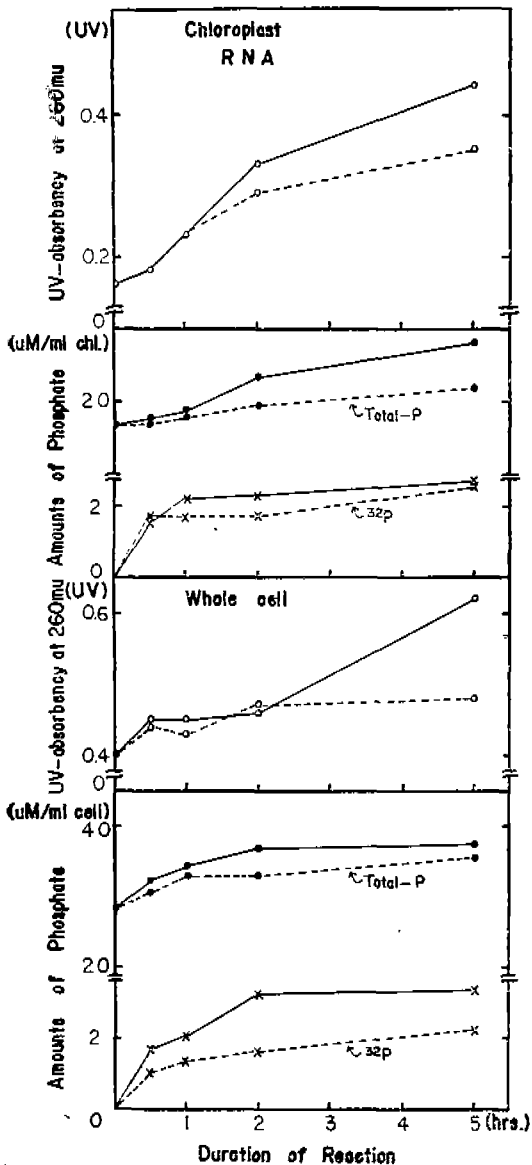


Fig. 9. Changes in amounts of ³²P, total-P and UV-absorbing material in RNA fraction of chloroplast isolated from spinach leaf and spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

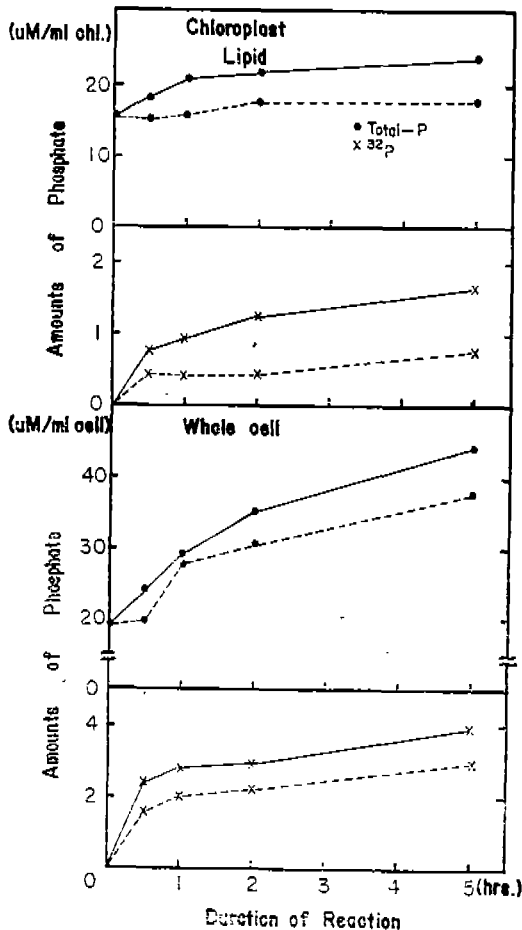


Fig. 10. Changes in amounts of ³²P, total-P in lipid fraction of chloroplast isolated from spinach leaf and spinach leaf cells during the reaction under the Light and dark. light—, dark.....

*reinhardtii*의 葉綠體는 光線을 조사할 때가 r-RNA의 合成이 촉진된다고 한 報告와 一致된다.

Lee(1967)는 phosphate pool에서 磷脂質이 合成된다고 하였고 Smirnov(1960) 및 Nakamura와 Yamada(1975)는 磷脂質이 合成될 때 phosphate pool에서의 磷酸의 轉換이 光線下에서 더욱 촉진된다고 하였다. Koehler와 Varner(1973)는 磷脂質로 轉換되는 ^{32}P 는 有機酸 pool을 통해 지나가기 때문에 이 pool이 磷脂質 合成의 precursor pool이 된다고 하였다. 分離한 葉綠體에 있어서 total-P는 whole cell system과 마찬가지로 反應期間동안 현저히 증가하였으나 ^{32}P 의 含量은 뚜렷하지 못하였다. 따라서 磷脂質 合成에 必要한 磷酸은 whole cell system과 마찬가지로 分離한 葉綠體에서도 酸不溶性 폴리인산으로부터 轉換되는 것으로

생자된다. 특히 反應시키는 동안에 暗處에 비해 明處에서 더욱 촉진된 것은 Smirnov(1960) 및 Nakamura와 Yamada(1975)의 見解와 一致된다.

지금까지 *Chlorella*, *E. coli*, *Neurospora*등 미생물 細胞內에서 폴리인산의 役割이 生理적으로 DNA, 蛋白質, 磷脂質등의 phosphate 源으로서 作用하며 細胞의 無機磷酸의 濃度を 調節하는 수단으로 作用할 수 있다는 Miyachi 와 Tamiya(1961 a), 李(1964), Gezelius(1974) 등의 見解는 시금치의 whole cell system 이나 分離한 葉綠體에서 폴리인산이 無機磷酸으로부터

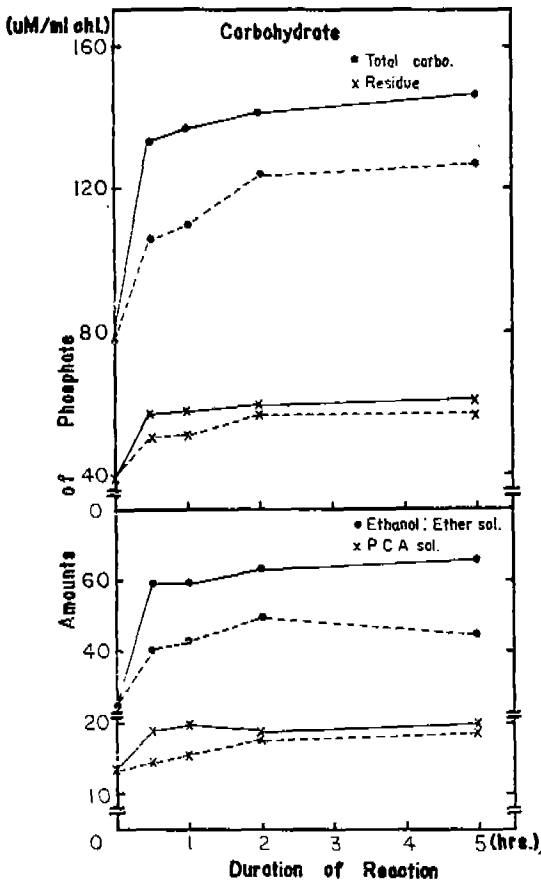


Fig. 11. Changes in amounts of carbohydrates (glucose equivalent) in each fraction of chloroplast isolated from spinach leaves during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

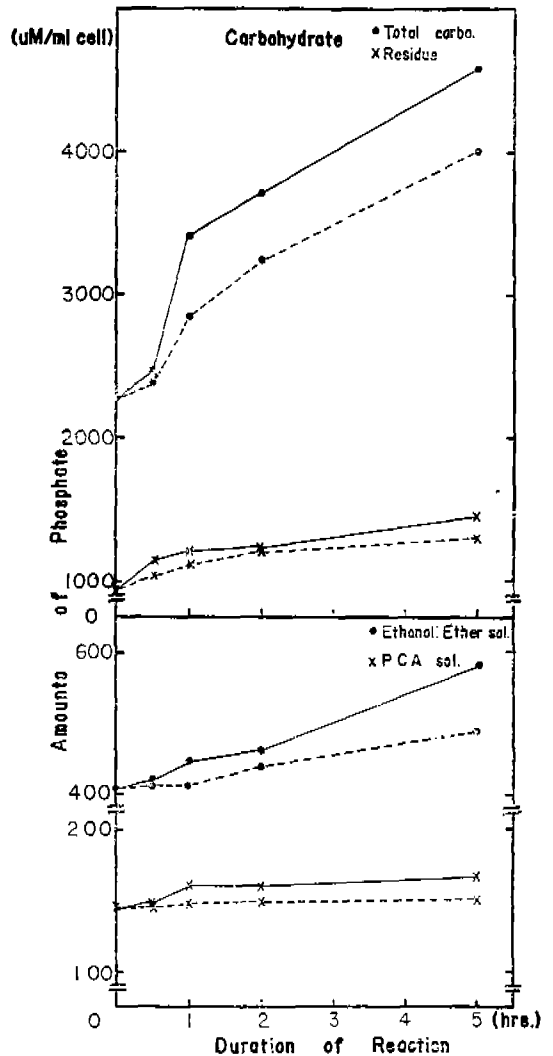


Fig. 12. Changes in amounts of carbohydrates (glucose equivalent) in each fraction of spinach leaf cells during the reaction under the light and dark. Light—, dark.....

形成되며 相互間 磷酸의 轉換이 일어난다. 이러한 경향은 本 研究의 結果와는 一致되나 細胞에서 分離된 葉綠體內에 폴리인산이 있음에도 불구하고 DNA 合成에 必要한 磷酸이 葉綠體外部에 있는 無機磷酸으로 부터 導入된다는 것이 特異하다.

摘 要

시금치에서 分離한 葉綠體를 0.5M sucrose, 50mM glucose, 100mM KH_2PO_4 , 0.2 μ M alanine, ^{32}P -phosphate가 포함된 tris buffer의 反應液에서 明處와 暗處에서 각각 反應시키고 反應의 中間期에 一定量의 葉綠體를 수확하여 分劃하고 여러가지 分劃區에 있어서의 磷酸化合物의 量的 變化를 폴리인산을 中心으로 追跡하고 蛋白質과 炭水化物的 含量도 測定하여 whole cell system에 있어서의 그것과 比較하였다.

1. 分離한 葉綠體에서의 DNA含量은 明處에서나 마찬가지로 暗處에서도 反應期間동안 약간 增加하였는데 이러한 경향은 whole cell system에서는 현저하였다.

分離한 葉綠體에 있어서 DNA分劃의 total-P의 含量의 增加는 전체적으로 ^{32}P 의 含量의 增加에 기인하는 것이었으나 whole cell system에서는 ^{32}P 의 增加에 비해 total-P의 增加가 더욱 현저하였다. 따라서 核의 DNA合成은 주로 細胞內의 phosphate pool에서 形成되나 分離한 葉綠體에서는 細胞質에서 吸收한 無機磷酸으로 부터 形成되는 것으로 생각된다.

2. 폴리인산은 whole cell system에서와 마찬가지로 分離한 葉綠體에서도 그의 存在가 確認되었다.

分離한 葉綠體에서의 酸可溶性 分劃의 ^{32}P 의 含量은 反應期間동안 光線下에서는 暗處에서 보다 현저히 增加하였는데 이는 주로 ^{32}P 의 sugar phosphate로의 轉換이 光線下에서 촉진되었기 때문이며, whole cell system에서도 비슷한 경향을 찾아 볼 수 있었으나 whole cell system에서는 특히 ortho-P의 增加가 光線下에서 더욱 현저하였다. 따라서 phosphate의 吸收는 光線의 조사에 의하여 촉진되며 葉綠體에서는 光線下에서 신속히 磷酸이 sugar phosphate로 轉換되는 것으로 생각된다.

Whole cell system에서는 酸不溶性 폴리인산의 含量이 反應期間동안 현저히 減少하였는데 이러한 경향은 分離한 葉綠體에서도 찾아볼 수 있었다. 따라서 酸不溶性 폴리인산은 葉綠體에 있어서의 비록 그 全量이 적기는 하였으나 細胞質에서나 마찬가지로 phosphate pool의 役割을 하는 것으로 짐작된다.

3. 分離한 葉綠體에 있어서의 蛋白質分劃의 total-P의 含量은 反應期間 동안 현저히 增加하였으나 ^{32}P 의

增加는 현저하지 아니하였고, 이러한 경향은 whole cell system에 있어서는 더욱 뚜렷하였다.

따라서 蛋白質 合成에 소모되는 磷酸은 whole cell system에서와 같이 葉綠體에 있어서도 酸不溶性 폴리인산으로 부터 轉換되는 것으로 생각된다.

4. Whole cell system과 마찬가지로 分離한 葉綠體에 있어서도 lipid分劃의 total-P가 ^{32}P 의 含量에 비해 현저히 增加한 것으로 보아 磷脂質 形成에 必要한 磷酸은 細胞質에서와 마찬가지로 分離한 葉綠體에서도 酸不溶性 폴리인산으로 부터 轉換된다고 생각된다.

5. Whole cell system과 마찬가지로 分離한 葉綠體에 있어서도 RNA 分劃의 ^{32}P 의 含量은 反應期間 동안 증가하였다. 따라서 RNA形成에 必要한 磷酸은 無機磷酸으로 부터 轉換된다고 생각된다.

參 考 文 獻

- App, A. A. and A. T. Jagendorf. 1964. ^{14}C amino acid incorporation by spinach chloroplast preparations. *Plant Physiol.* 39 : 772-776.
- Arnon D. I., M. B. Allen, and F. R. Whatley. 1967. In *Molecular and Cell Biology of Dickenson series on contemporary thought in Biological series.* p.144-155.
- Avron, M. 1960. Photophosphorylation by swisschard chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta.* 40 : 257-272.
- Belozersky, A. N. and I. S. Klulaev. 1957. Polyphosphate and their significance in the development of *Aspergillus niger*. *Biochem. (Russia)* 22 : 27-36. (English translation)
- Berenblum, I. and E. Chain. 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.* 32 : 295-298.
- Bove, J. and D. Raacke. 1959. *Arch. Biochem. Biophys.* 85 : 521.
- Bucke C., A. Walker, and C. W. Baldry. 1966. Some effects of sugars and sugar phosphate on carbon dioxide fixation by isolated chloroplast. *Biochem.* 101 : 634-641.
- Correl, D. L. and N. E. Tolbert. 1962. Ribonucleic acid-polyphosphate algae. I. Isolation and physiology. *Plant Physiol.* 37 : 627-636.
- _____. 1964. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. II. Physical and chemical properties of the isolated complexes. *Plant and Cell Physiol.* 5 : 171-191.
- _____. 1965. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. III. Hydrolysis studies. *Ibid.* 6 : 661-669.
- Crane, R. K. and F. Lipman. 1953. The effects of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 201 : 235-243.
- Eisenstadt, J. M. and G. Bgawarman. 1963. The incorporation of amino acid into the protein of chloroplast and chloroplast ribosome of *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 76 : 319-321.
- Fiske, C. H. and Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 : 375.

- Gezelius, K. 1974. Inorganic polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Microbiol.* 97 : 311—329.
- Givan, C. V. and P. K. Stumpt. 1971. Fat metabolism in higher plant. XIV. Some factors regulating fatty acid synthesis by isolated spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 47 : 510—515.
- Jensen, R. G. and J. A. Bassham. 1966. Photosynthesis by isolated chloroplast. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 56 : 1095—1101.
- Kirk, P. R. and R. M. Leech. 1972. Amino acid biosynthesis by isolated chloroplast during photosynthesis. *Plant Physiol.* 50 : 228—234.
- Koehler, D. E. and J. E. Varner. 1973. Hormonal control of orthophosphate incorporation into phospholipid of Barky Aleone layers. *Ibid.* 52 : 208—214.
- Krogmann, D. W., A. T. Jagendorf, and M. Avrion. 1959. Uncouplers of spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. *Ibid.* 34 : 272—277.
- Kulaev, I. S. and A. N. Belozersky. 1957. A study of the physiological role of polyphosphate in the development of *Aspergillus niger*, using radiophosphorus (^{32}P). *Biochem. (Russia)* 22 : 545—554. (English translation).
- 李永祿. 1964. *Chlorella*의 磷酸代謝에 관한 研究, 微學誌, 2(1) : 1—11.
- 李永祿·陣野. 1966. ^{32}P -labeled *Chlorella*의 正常培地에 있어서의 ^{32}P 및 total P의 轉換, 微學誌, 4(1) : 14—20.
- 李永祿·陣野. 1966. *Chlorella*의 物質代謝에 있어서의 細胞內 폴리인산의 役割, 高大理工論集 第8輯, p. 173—185.
- Lee, Y.N. 1967. Incorporation of phosphate into protein and other nitrogenous compounds in *Chlorella* cells. *Kor. Jour. Microbiol.* 5 : 19—26.
- 李永祿·陣野·沈雄燮. 1966. *Chlorella*의 磷酸代謝에 미치는 無機鹽類의 影響, 原子力研究論文集 第8輯 第2部 p. 5—11.
- Levi, C. and M. Gibbs. 1975. Carbon dioxide fixation in isolated *Kalanchoe* chloroplast. *Plant Physiol.* 56, No. 1.
- Lyttleton, J. W. 1962. Isolation of ribosome from spinach chloroplast. *Exp. Cell Research* 26 : 312—317.
- Magalhaes, 1974. Nitrite assimilation and amino nitrogen synthesis in isolated spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 53 : 411—415.
- Mahtab, S. B. and A. T. Jagendorf. 1966. Amino acid incorporation by wheat chloroplast. *Ibid.* 41 : 764—770.
- Matsuda, Y. 1974. *Biochem. Biophys. Acta.* 36 : 45—55.
- Miyachi, S. 1961. Inorganic polyphosphate in spinach leaves. *J. Biochem.* 50 : 364—371.
- _____. and H. Tamiya. 1961a. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *Plant and Cell Physiol.* 2 : 415—424.
- _____. and _____. 1961b. Some observation on the phosphorus metabolism in growing *Chlorella* cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 46 : 200—202.
- Nakamura, Y. and M. Yamada. 1975. Fatty acid synthesis by spinach chloroplast I. Property of fatty acid synthesis from acetate. *Plant and Cell Physiol.* 16 : 139—149.
- Nesmeyanova, M. A., A. D. Dmitriev, and I. S. Kulaev. 1974. *Mikrobiologia* 43 : 227—234.
- Nihei, T. 1955. A phosphorylative process, accompanied photochemical liberation of oxygen, occurring at the stage of nuclear division in *Chlorella* cells. I. *J. Biochem. (Tokyo)* 42 : 245—256.
- _____. 1957. A phosphorylative process, accompanied by photochemical liberation of oxygen, occurring at the stage of nuclear division in *Chlorella* cells. II. *Ibid.* 44 : 396—398.
- Roberts, G. R., A. J. Keys, and C. P. Whittingen. 1970. The transport of photosynthetic products from the chloroplast of tobacco leaves. *J. Exp. Bot.* 21 : 683—692.
- Rose, R. J. and D. G. Gramm. 1974. Distribution of DNA in dividing spinach chloroplast. *Nature* 251.
- Robinson, J. M. and C. R. Stocking. 1968. Oxygen evolution and the permeability of the outer envelope of isolated whole chloroplast. *Plant Physiol.* 43 : 1597—1604.
- Schmidt, G. and S. J. Tannhauser. 1945. A methods for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* 161 : 83—89.
- Schweiger, H. G. and S. Berger. 1964. DNA-dependent RNA synthesis in chloroplast of *Acetabularia*. *Biochem. Biophys. Acta.* 87 : 533—535.
- Scott, T. A. and E. H. Melvin. 1953. *Anal. Chem.*, 1950. In methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1. (Whitler, R.L. et al, ed.) 1962. Academic Press Inc. p. 400.
- Semal, J., D. Spencer, Y. T. Kim, and S. G. Wildman. 1964. Properties of a ribonucleic acid synthesizing system in cell-free extracts of tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Acta.* 91 : 205—216.
- Sissakian, N. M. 1958. *Advances in Enzymol.* 20 : 201.
- Smirnov, B. P. 1960. The biosynthesis of higher acids from acetate in isolated chloroplasts of *spinacia oleacea* leaves. *Biokhimiya* 25 : 545—555.
- Tewari, K. K. and S. G. Wildman. 1967. DNA polymerase in isolated tobacco chloroplast and nature of the polymerized product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58 : 689—696.
- Troll, W. and R. K. Cannon. 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.* 200 : 803—811.
- Winder, F. G. and J. M. Denny. 1956. Phosphorus metabolism of *Mycobacteria*; Determination of phosphorus compounds in some *Mycobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 15 : 1—18.
- Wintermans, J. F. G. M. 1955. Polyphosphate formation *Chlorella* in relation to photosynthesis. *Medel Landbou-wogeschool Wageningen* 55 : 99—126.
- Yamada, M. and Y. Nakamura. 1975. Fatty acid synthesis by spinach chloroplast II. The path from PGA to fatty acid. *Plant and Cell Physiol.* 16 : 151—162.
- Zaitseva, G. N., A. N. Belozersky, and L. YU. Frolova. 1960. Oxidative phosphorylation and synthesis of polyphosphate in the cells of *Azotobacter vinilandi*. Cited in Correl et al. *Plant Physiol.* 37 : 627—636. (1976. 8. 11. 접수)