

전자스핀공명스펙트럼에 의한 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포환 연구

임형순·강사옥

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

Studies on the Cell Cycle of *Saccharomyces cerevisiae* by Electron Spin Resonance Spectroscopy

Yim, Hyung Soon and Sa-Ouk Kang

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Seoul National University

ABSTRACT: The intracellular free radicals produced at different stages of cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 were investigated by means of electron spin resonance(ESR) spectroscopy. The synchronized cells by repeated starvation and refeeding revealed different ESR spectral pattern compared to that of asynchronized cells. Each spectrum centered at $g = 2.005$, which indicates free radicals. The relative spin concentration was maximal at the end of DNA increase. The variation of the relative spin concentration at each distinct stage of the cell cycle was evaluated in relation to ascorbate concentration, L-galactonolactone oxidase activity, and ascorbate oxidase activity. The highest activities of L-galactonolactone oxidase and ascorbate oxidase were detected just before and at the maximum of relative spin concentration, respectively. And ascorbate concentration fluctuated through each stage of cell cycle with the changes of relative spin concentration, L-galactonolactone oxidase activity, and ascorbate oxidase activity. Thus it is suggested that intracellular free radicals should be related to cell cycle, interacted with ascorbate, and may play an important role in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*.

KEY WORDS *Saccharomyces cerevisiae*, cell cycle, free radical, electron spin resonance spectroscopy, ascorbic acid.

자유 라디칼(free radical)은 홀수개의 전자를 갖는 원자나 분자로서 1930년대부터 라디칼 반응 기작이 설명되기 시작하였고, 석유의 열분해(thermal cracking), 플라스틱 생성 공정 등 산업 분야 뿐만 아니라, 호흡, 광합성 등 생명현상에도 라디칼 중간물질(radical intermediate)이 관여한다. 따라서 이 분야의 연구가 매우 가치있는 것으로 평가되고 있다. 그러나 라디칼 검출 방법에 있어서는 라디칼의 반응성 때문에 많은 어려움이 있다. NO₂같이 비교적 안정한 라디칼은 일반적인 화학반응을 이용하고, 보다 반응성이 있는 라디칼은 trapping 같은 간접적인 방법을 이용한다. 최

근에는 라디칼의 자기적 성질을 이용한 전자 스핀 공명 분광법(electron spin resonance spectroscopy, ESR)이 생물학 분야에서 많이 활용되고 있다(Pryor, 1966).

라디칼은 생체내에서 lipid hydroperoxides같은 initiator molecule의 균형 분해(homolysis)(Pryor, 1966), 금속이온으로부터 1전자의 전달(Poyer 등, 1971), 효소 반응(Yamazaki, 1971), 방사선(radiation), 오존, 광분해(photolysis) 등에 의해 만들어지며, 이렇게 생성된 자유라디칼은 독성을 지니고 만성발전(Edwards 등, 1984), 식균작용(Badwey 등, 1980), 광

합성(Pryor, 1976a), 노화(Harmun, 1982), 암(Lohmann 등, 1979a) 등에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 노화의 자유라디칼이론(free radical theory of ageing)은 생체내에서 생성되는 자유라디칼을 방어하는 기작이 점진적으로 결손됨으로 조직이 파괴되어 노화가 진행된다고 설명하고 있다. 발암물질이 전자 공여체(donor)나 수용체(acceptor)로 작용함으로써 전자기동경로나 kinetic equilibrium을 변형시킨다고 보고된 바 있다(Szent-Györgi 등, 1966). 이런경우, 발암물질은 정상적인 생물체에는 존재하지 않는 자유라디칼을 생성하게 된다. 이같은 가정에서 ESR 스펙트럼의 변화를 예견할 수 있으며 상반된 결과가 나오긴 하지만 실제로 이 분야에 관한 연구가 진행되어 왔다(Dodd, 1980; Swartz, 1979). 쥐간(rat liver)의 발암과정에서 ESR signal의 변화도 관찰할 수 있었다(Vithayathil 등, 1965). 또한, 급성 백혈병 환자의 동결건조된 혈액에는 정상인에게서는 관찰되지 않는 signal이 $g=2.005$ 에서 spin 농도의 증가를 보이며(Lohmann 등, 1979a), 이 signal이 semidehydroascorbate(SDA) 라디칼에 기인한다고 보고된 바 있다(Lohmann 등, 1979b, c). 그러나 아직 이 스펙트럼이 SDA 라디칼 인지에 대한 논란이 계속되고 있다.

본 논문에서는 노화와 암이 세포분열과 직접적인 관계를 갖는다는 측면에서 자유라디칼과 세포환의 연관성을 ESR spectroscopy을 이용하여 알아 보고자 하였다.

지금까지 ESR을 이용한 연구가 주로 고등생물 특히, 사람의 세포를 대상으로 하였고, 사용된 세포들의 세포분열이 일정하게 일어나는 것이 아니었으므로 세포환과 자유라디칼과의 정확한 관계를 연구하는데 큰 도움이 되지 못하였다. 따라서 본 실험에서는 미생물 가운데 고등생물의 세포와 유사하며 연구가 많이 된 *Saccharomyces cerevisiae*을 이용하였고 동조 배양을 함으로써 세포들의 세포분열이 균일하게 일어나도록 하였다. 세포가 나타낸 스펙트럼을 규명하기 위해 여러가지 효소 활성도와 자유라디칼 제거제(scavenger)의 농도를 측정하여 DNA 량 외에 세포환에 대한 새로운 기준을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858을 이용하였고, Yeast extract-Peptone-Dextrose(YPD) 한천사면배지에 접종, 30°C에서 배양해 4°C에서 보관하였다. YPD 한천사면배지의 조성은 l당 다음과 같다; Yeast extract 20.0g, Peptone 10.0g, Dextrose 10.0g, Agar 15.0g. 실험시에는 백금으로 한천사면배지로부터 두배 농도의 Wickerham's malt extract 배지에 접종하여 종균으로 삼았는데 Wickerham's malt extract 배지의 조성은 l당 다음과 같다(Wickerham, 1951); Yeast extract 3.0g, Malt extract 3.0g, Peptone 5.0g, Glucose 10.0g.

Synchronous culture(동조 배양)

Williamson(1962)의 방법을 사용하였다. 두배 농도의 Wickerham's malt extract 배지 250ml에 *S. cerevisiae*를 접종하여 25°C에서 10일간 배양하였다. 10일간 배양된 세포는 그 크기에 따라 두 가지 종류로 나뉘는데, 약 40%에 해당하는 작은 세포들은 동조배양에 부적합하므로 분별 원심분리법으로 제거하였다(Williamson 등, 1961). 종균을 3000×g에서 10분간 원심분리하여 수확한 후 증류수로 2번 세척하였다. 수확한 세포들을 15% mannitol 수용액에 현탁액을 만들고 600×g에서 2-6분 동안 원심분리하여 상층액을 버렸다. 침전된 세포를 5-6회 반복하여 분별 원심분리하였다. 미리 25°C로 고정된 120ml의 2배 농도 Wickerham's malt extract 배지에 침전된 세포들을 40분 동안 배양한 후 수확하여 starvation medium으로 3번 세척하였다. 세척한 세포를 120ml starvation medium에서 6시간 동안 강력하게 진탕하면서 배양하였다. 이때 모든 조작은 무균조작으로 하며 일정한 온도를 유지하여야 한다. Wickerham's malt extract 배지에서 배양과 starvation medium에서의 6시간 배양하는 과정을 2-3일에 걸쳐 연속적으로 3회 이상 실시하여 동조 배양된 *S. cerevisiae*를 얻었다. 이때 사용되는 starvation medium의 조성은 다음과 같다(Williamson 등, 1960); KCl 0.01 M, CaCl₂ 0.0024 M,

MgCl₂ 0.0025 M.

Asynchronous culture

동조 배양(synchronization)된 세포에 대한 대조구로 *Saccharomyces cerevisiae*를 asynchronous culture하였다. 두배 농도의 Wickerham's malt extract 배지 100 ml에 종균을 만들어 12시간 배양 후, 동일 배지 1 l에 접종하였다. 25°C에서 21시간 동안 배양하면서 접종시간을 0시간으로 하여 3시간마다 시료를 채취하였다.

표본 추출 방법

최종적으로 starvation medium에서 6시간 동안 배양한 세포들을 2배 농도의 Wickerham's malt extract 배지 720 ml에 접종하였다. 25°C에서 배양하며 접종한 시간을 기준으로 15분 간격으로 70 ml씩 표본 추출을 하여 16개의 표본을 준비하였다. 표본은 곧 바로 얼음에 보관하고 4°C에서 원심분리한 다음 3차 증류수로 2번 세척하였다.

균수 측정

추출된 표본에서 0.5 ml을 20배 희석시켜 보관하였다. 이때, 최종농도가 1% 정도 되도록 formalin으로 고정시켰다. Haemocytometer를 이용하여 균수를 측정하였으며 출아하는 세포인 경우 Williamson(1960)의 기준에 따라 계산하였다.

ESR spectroscopy

3차 증류수로 2번 세척한 세포들을 액체질소로 급속 냉각시키고 20시간 이상 동결 건조시켰다. 동결 건조된 세포들을 3 mm ESR tube에 40 mg씩 넣고, Varian E-9 100 KHz modulation X-band spectrometer를 이용하여 측정하였다. DPPH (diphenylpicrylhydrazil, $g = 2.0036$)의 peak를 기준으로 삼고 amplitude는 2.0×10^6 , receiver gain은 3.2×10 , scan range는 200 G로 동일조건에서 실험하였다. Microwave power는 asynchronous culture는 0.5 mW, 동조배양은 5 mW에서 실시하였다. Field는 3380 G, microwave frequency는 9.51 GHz로 고정하였다.

조효소(Crude extract)

수확된 균체를 5 ml의 0.1 M 인산-시트르산 완충용액(pH 5.6)으로 현탁액을 만들었다. 이중 4 ml를 glass bead(Sigma co. 425-600 microns)와 함께 Omni Mixer(Du Pont Instrument No 17047)로 3분정도 균체를 파괴시키고 3000×g에

서 20분간 원심분리한 후 상층액을 조효소로 이용하였다.

DNA 정량

Diphenylamine test로 DNA 양을 측정하였다. Stewart(1975)의 방법으로 DNA를 추출하였고 diphenylamine test는 Giles와 Myers(1965)의 방법에 의거하여 시행하였다. 조효소를 만들기 위해 준비한 5 ml 현탁액 가운데 1 ml를 원심분리하고 이를 10% perchloric acid 1.3 ml에서 15분동안 얼음에 보관하였고 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 다시 10% perchloric acid 1.3 ml씩을 첨가하여 80°C에서 20분동안 방치한 후 원심분리하고 상층액 중 1 ml을 *S. cerevisiae*의 DNA 추출액으로 삼았다. DNA 추출액 1 ml와 동량의 diphenylamine reagent를 혼합하고 여기에 0.1% acetaldehyde를 0.1 ml 가한 후 30°C에서 하룻밤 방치하여 파장 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. DNA 양을 결정하기 위한 표준 시료로는 herring sperm DNA(Sigma) 8 mg을 20 ml의 5 mM NaOH에 녹인 후 사용 직전 10% perchloric acid로 희석하고 80°C에서 20분간 방치하여 이용하였다.

단백질 정량

Coomassie brilliant blue G 250 dye를 이용하는 Bradford법(1976)을 사용하였으며 표준 단백질로 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다.

Ascorbic acid 농도 측정

Zannoni 등(1974)의 방법을 채택하여 측정하였다. 조효소 1 ml에 50% trichloroacetic acid 0.2 ml을 넣어 단백질을 침전시키고 원심분리 한후, 상층액 1 ml에 98% o-phosphoric acid 0.2 ml, 1% α, α' -dipyridyl 1 ml, 3% FeCl₃ 0.12 ml을 첨가하여 35°C에서 15분간 방치하였다. 이 반응액을 Gilford 250 spectrophotometer(Gilford Instrument Laboratories Inc.)를 이용하여 525 nm의 흡광도로 측정하였다.

Galactonolactone oxidase 활성도 측정

Zannoni 등(1974)의 방법을 이용하였다. 반응 혼합물은 3 mM L-galactono-1,4-lactone 0.1 ml, 조효소 0.2 ml, 0.1 M 인산-시트르산 완충용액(pH 5.6) 1.0 ml를 포함하였다. 이 반응 혼합물을 35°C에서 15분간 반응 시킨 후 50% trichloro-

acetic acid 0.2ml을 넣어 반응을 중단 시킨 후 침전된 단백질을 원심분리하였다. 상층액 1ml을 ascorbic acid 농도 측정과 동일한 방법으로 반응시켜 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1분당 1 μmol L-ascorbic acid을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Ascorbate oxidase 활성도 측정

Boehringer Mannheim(W. Germany) Co. Ltd에서 제안한 방법을 사용하였다. L-Ascorbate solution은 11 mg L-ascorbic acid를 0.1 M 인산-시트르산 완충용액 (pH 5.6) 20 ml에 녹여 이용하였다. 각 조효소를 투석막에 넣고 0.1 M 인산-시트르산 완충용액 (pH 5.6)에서 4°C로 유지하여 24 시간 동안 투석시킨 후 활성도를 측정하였다. 완충용액 2.70 ml에 조효소 0.25 ml을 첨가하고 L-ascorbate solution 0.07 ml를 넣어 반응을 시작하였다. L-Ascorbate는 265 nm에서 최대 흡광도를 가지므로 Gilford 250 spectrophotometer를 사용하여 265 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 효소 활성 단위는 다음과 같이 산출해 내어 정의하였다.

$$\Delta E / \text{min} = \Delta E / \text{min, sample} - \Delta E / \text{min, blank}$$

$$\text{L-Ascorbate Oxidase Volumetric activity} = \frac{\text{반응량 (ml)} \times \Delta E / \text{min}}{13.2 \times \text{조효소량 (ml)} \times [\text{units / ml sample solution}]}$$

결과 및 고찰

Asynchronous culture의 ESR 스펙트럼 변화

Asynchronous culture로부터 얻은 시료에서 나온 ESR 스펙트럼을 다음식에 의해 g value를 계산하였다 (Fig. 1).

$$g = \frac{h\nu}{\beta H}$$

여기서 h는 Planck constant, β는 Bohr magneton, ν는 microwave frequency, H는 magnetic field를 나타낸다. 이때 DPPH (g=2.0036)로 보정하였다. Fig. 1에서 화살표시한 부분이 g=2.005 이다. 대수기 초기 (early exponential stage)에는 자유라디칼이 많이 생성

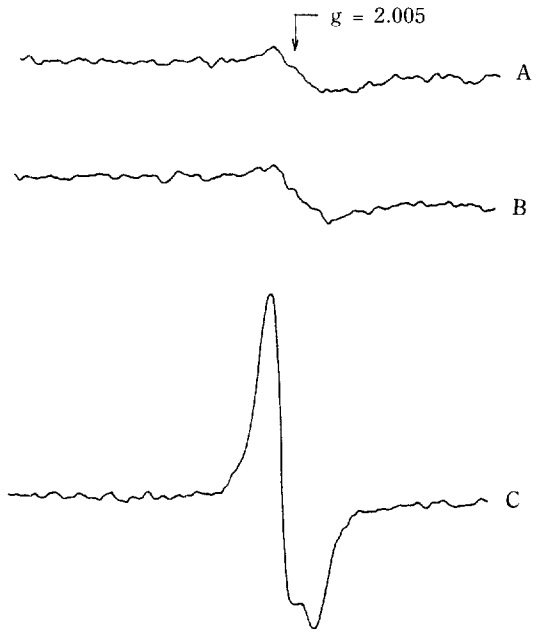


Fig. 1. ESR spectra of asynchronously growing *Saccharomyces cerevisiae*: A; 3 hrs, B; 21 hrs, C; B+ 10 mM ascorbate 1 ml.

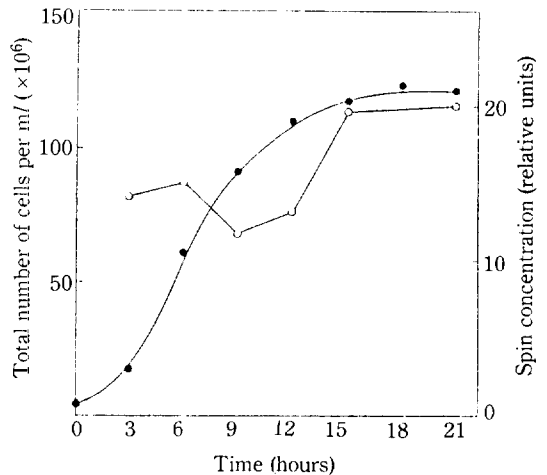


Fig. 2. Change of the relative spin concentration of asynchronously growing *Saccharomyces cerevisiae*: A; total number of cells per ml(●), B; relative spin concentration(○).

되다가 대수기 후기 (late exponential stage)에는 감소, 다시 정체기 (stationary stage)에 들어가면서 자유라디칼 양이 조금씩 증가하는 양상을 보여 주고 있다 (Fig. 2).

21시간에 추출한 표본을 동결 건조 전에 10mM ascorbate 1ml을 첨가하였을 경우 그 spin 농도가 크게 증가하였다(Fig. 1C) (Lohmann 1979b). 이것으로 미루어 볼 때 이 자유라디칼은 SDA 라디칼이거나 ascorbate와 상호작용하여 spin 농도의 증가가 나타난 것으로 보인다.

동조 배양된 *S. cerevisiae*의 ESR 스펙트럼 변화

동조 배양 정도를 알아보기 위해서 다음과 같이 synchrony index (Blumenthal 등, 1962)를 계산하였다.

$$F = (N_t / N_0 - 2^{\alpha/\beta})$$

이때 N_t 은 분열 후 세포수, N_0 는 분열 전 세포수, α 는 분열하는데 걸린 시간, β 는 평균 세대 시간을 나타내는 것이다. 일반적으로 F 값이 0.6-0.85 사이일 경우 동조 배양이 만족스러운 것으로 평가하는데 (David 등, 1982) 본 실험에서는 약 0.66 정도가 되었다. 동조 배양된 표본의 ESR 스펙트럼은 asynchronous culture에서 나타나는 g-value와 스펙트럼의 구조에 있어서 유사하다 (Fig. 3). 자유라디칼 생성 양상을 보면 DNA 복제가 진행될 때 적은 양이 생성되나 DNA 복제가 마무리 될 때 가장 많이 생성되는 것으로 나타났

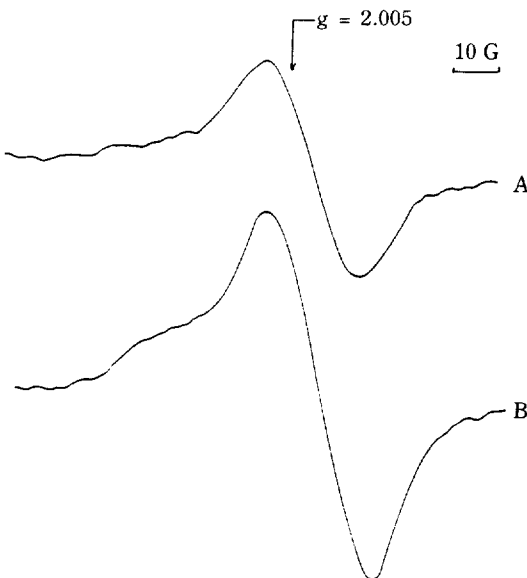


Fig. 3. ESR spectra of synchronously growing *S. cerevisiae*: A; sample 8, B; sample 11.

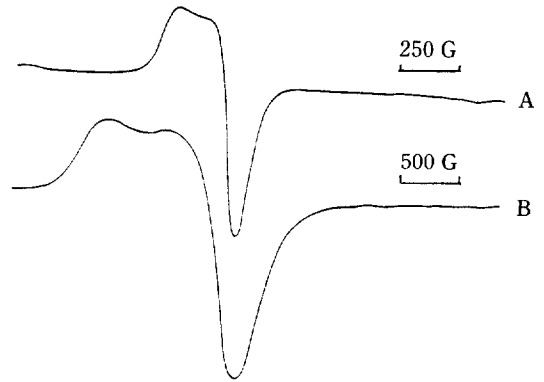


Fig. 4. ESR spectra of sample 11 measured at low temperature: A; scan range 5 x 1 KG, B; scan range 10 x 1 KG.

다. 그리고 그 후에 다시 감소하는 양상을 보인다 (Fig. 5C).

액체질소를 이용하여 저온에서 표본 11의 ESR 스펙트럼을 얻었다 (Fig. 4). Receiver gain을 1.25×10 으로 줄였고, scan range를 5x1, 10x1 KG로 늘렸다. 즉, 저온에서 실험한 결과 이 스펙트럼이 현저하게 broadening을 일으켰다. 일반적으로 ESR spectroscopy에서는 저온 실험일 경우 전이금속의 스펙트럼은 linewidth가 좁아진다 (Fraenkel, 1967; Freed 등, 1963). 그러나 Fig. 4와 같이 broadening이 일어났다는 사실은 이 스펙트럼은 자유라디칼에 의한 것임을 뒷받침해 준다.

ESR 스펙트럼의 분석

Fig. 1과 같이 ascorbate 첨가시 자유라디칼이 증가하는 양상과 ascorbate의 자유라디칼 제거제로서의 역할, dehydroascorbate가 세포분열에 관계한다 (Edgar, 1970)는 사실에서 ascorbate의 생성과 분해를 세포분화와 연관지어 실험을 진행하였다.

Galactonolactone oxidase는 *S. cerevisiae*에서 L-ascorbate를 생성하는 효소로 알려져 있다 (Bleeg 등, 1982). 동조 배양된 *S. cerevisiae*의 시료에서 만든 각 조효소로부터 서로 다른 활성도가 나타났다 (Fig. 5D). 다른 표본에서는 거의 활성도를 보이지 않았으나 spin 농도가 최고에 이르기 바로 전, 단백질이 활발히 합성될 때 galactonolactone oxidase의 활성도가 크게 증가하는 현상이

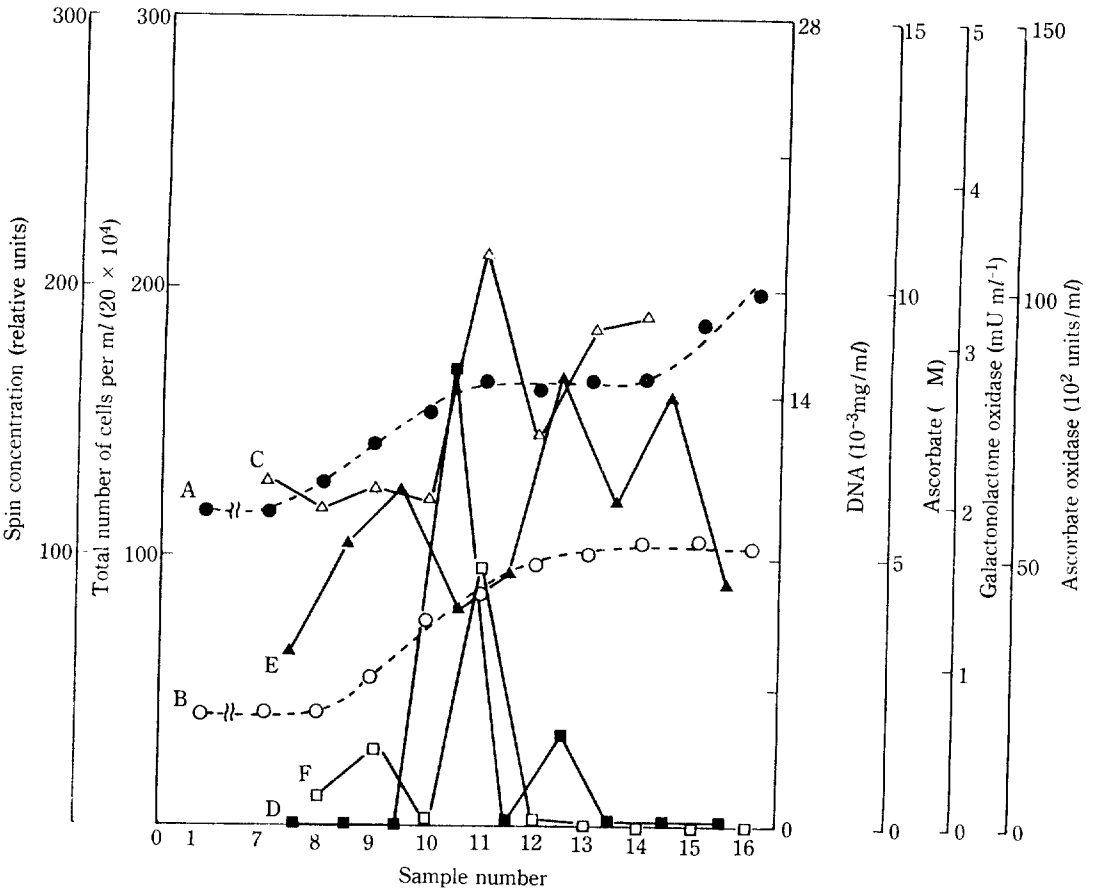


Fig. 5. Overall criteria obtained from this experiment: A; DNA(●), B; protein(○), C; relative spin concentration(△), D; galactonolactone oxidase activity(■), E; ascorbate concentration(▲), F; ascorbate oxidase activity(□).

관찰되었다.

Ascorbate oxidase는 ascorbate를 dehydroascorbate로 산화하는 효소이다(Nakamura 등, 1968; Dawson 등, 1973; Marchesini 등, 1978). Ascorbate oxidase의 활성도가 크게 증가한 부분과 자유라디칼이 최고조에 이르는 부분이 일치하는 양상을 보였다(Fig.5F). 이는 ascorbate oxidase가 ascorbate를 산화시킬 때 발생하는 ascorbyl radical과 깊은 연관이 있는 것으로 보여진다.

조효소로 이용하기 위해 준비된 시료들의 ascorbate 농도를 측정하였다(Fig.5E). L-Galactonolactone oxidase 활성도(Fig.5D)는 ascorbate oxidase 활성도(Fig.5F)와는 크게 다른 양상을 보였다. spin 농도가 가장 많이 생성될 무렵 ascorbate 농도가 감소된다. 그 후 요동

(fluctuation)하면서 전체적으로 증가하는 현상을 보인다.

Vanin 등(1966)과 Nalbandyan(1966)이 yeast의 g-value를 2.003으로 구하여 본 실험과의 차이를 보이고 있으며, Lohmann 등(1979a)이 급성백혈병 환자의 혈액으로부터 얻은 ESR 스펙트럼의 전체적인 구조가 S-모양을 갖는 것과 유사하다. 그러나 Lohmann 등의 ESR 스펙트럼에서는 Mn 스펙트럼이 나타났지만, *S. cerevisiae*에서 나온 스펙트럼의 경우, Mn 스펙트럼이 자유라디칼의 스펙트럼과 많이 중첩되어 있는 것으로 보인다.

세포환에 따른 효소 활성도의 주기성은 *S. cerevisiae*에서 이미 30여종이 보고되었고(Gorman 등, 1964; Saunders 등, 1975), 실험에서 나타난 ascorbate oxidase(Fig.5F)와 galactonolactone oxidase(Fig.5D)의 활성도도

이 부류에 속한다고 보여진다.

$g=2.005$ 에서 스펙트럼을 나타내는 정확한 자유라디칼을 단정짓기 어려우므로 두 가지 가정하에서 본 실험자료를 해석해 나가야 할 것이다.

첫째로 이 자유라디칼이 SDA 라디칼인 경우 galactonolactone oxidase에 의해 합성된 ascorbate가 빠른 속도로 ascorbate oxidase에 의해 산화되고 그 후에 비로소 ascorbate가 일정량 이상 나타난다. 이 경우 SDA가 직접적으로 세포환과

연관되어서 세포분열 혹은 DNA 합성을 방해하는 것으로 보인다.

둘째로 SDA가 아닌 다른 라디칼에 의해 스펙트럼이 나타난 경우, ascorbate가 라디칼 제거제로 작용한다고 볼 수 있다. 즉, galactonolactone oxidase가 만들어낸 ascorbate는 ascorbate oxidase에 의해 SDA가 되어 이 때 발생한 다른 자유라디칼의 제거제로 이용된다. 이 경우에는 ascorbate가 간접적으로 세포환을 조절하게 된다.

적 요

Saccharomyces cerevisiae ATCC 24858 세포환의 서로 다른 stage에서 생성되는 자유라디칼을 electron spin resonance(ESR) spectroscopy를 이용하여 알아보았다. Starvation과 refeeding을 반복하여 동조 배양된 세포는 asynchronized cell의 ESR 스펙트럼 경향과 다른 결과를 보였다. 각 스펙트럼들은 $g=2.005$ 에서 자유라디칼의 signal을 나타내었다. 상대스핀농도(relative spin concentration)는 DNA 증가가 끝나는 때에 최고값을 보인다. 세포환의 각 stage에서 다르게 나타난 상대스핀농도의 변화를 ascorbate 농도, L-galactonolactone oxidase 활성도, ascorbate oxidase 활성도와 관련지어 연구하였다. L-galactonolactone oxidase는 상대스핀농도가 최고값을 갖기 직전, ascorbate oxidase는 상대스핀농도가 최고값을 갖을 때 가장 높은 활성도를 갖는다. Ascorbate 농도는 상대스핀농도, L-galactonolactone oxidase 활성도, ascorbate oxidase 활성도의 변화에 따라 세포환의 각 stage에서 요동(fluctuation)한다. 따라서, 자유라디칼은 세포환에 관여하며 ascorbate와 연관성을 갖고 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포환에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구를 위하여 ESR spectrometer를 사용하게 해주신 명지대학교 물리학과 최 덕 교수님 이하 여러분께 감사의 말씀을 드립니다. 본 연구는 한국과학재단 국제공동연구비로 진행되었다.

REFERENCES

1. Badwey, J.A., and M.L. Karmovsky, 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 695-726.
2. Blumenthal, L.K., and S.A. Zahler, 1962. Index for measurement of synchronization of cell populations. *Science* **135**, 724.
3. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
4. David, L., R.K. Poole, and S.W. Edwards, 1982. *The Cell Division Cycle*. pp. 44-93. Academic Press, New York.
5. Dawson, C., 1973. Ascorbate oxidase further studies on the purification of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **248**, 6596-6602.
6. Dadd, N.J.F., 1980. Metal Ions in Biological Systems Vol. 10, pp. 95-128. Marcel Decker, New York.
7. Edgar, J.A., 1970. Dehydroascorbic acid and cell division. *Nature* **227**, 24-26.
8. Edwards, S.W., M.B. Hallett, and A.K. Campbell, 1984. Oxygen radical production during inflammation may be limited by oxygen concentration. *Biochem. J.* **217**, 851-854.
9. Francel, G.K., 1967. Linewidths and frequency shifts in electron spin resonance spectra. *J. Phys. Chem.* **71**, 139-171.
10. Freed, J.H., and G.K. Francel, 1963. Theory of Linewidths in electron spin resonance spectra. *J. Chem. Phys.* **39**, 326-348.
11. Giles, K.W., and A. Myers, 1965. An improv-

- ed diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**, 93.
12. Gorman, J., P. Taruo, M. LaBerge, and H. Halvorson, 1964. Timing of enzyme synthesis during synchronous division in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 43.
 13. Harman, D., 1982. The free radical theory of ageing. In *Free radicals in biology*. Vol. V. Academic Press, London. pp. 255.
 14. Lohmann, W., J. Schreiber, H. Gerhardt, H. Breithaupt, H. Löffler, and H. Pralle, 1979a. ESR investigations on blood of patients with leukemia. *Blut* **39**, 147-151.
 15. Lohmann, W., J. Schreiber, W. Strobelt, and C. Müller-Eckhardt, 1979b. On the Possible involvement of ascorbic acid and copper proteins in leukemia; I. Electron Spin Resonance (ESR) investigations on native blood, erythrocytes, and leukocytes. *Blut* **39**, 317-332.
 16. Lohmann, W., W. Greulich, and G. Döll, 1979.c. On the possible involvement of ascorbic acid and copper proteins in leukemia; II. Electron Spin Resonance (ESR) and Atomic Absorption investigations on erythrocyte ghosts and plasma. *Blut* **39**, 327-332.
 17. Marchesini, A., and P.M.H. Kroneck, 1979. Ascorbate oxidase from Cucurbita pepo medullosa: New method of purification and reinvestigation of properties. *Eur. J. Biochem.* **101**, 65-76.
 18. Nakamura, T., N. Makino, and Y. Ogura, 1968. Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber. *J. Biochem.* **64**(2), 189-195.
 19. Nalbandyan, R.M., and L.A. Shifman, 1966. Biochemical nature of the electron paramagnetic resonance S signal in yeast cells. (I) *Biofizika* **11**, 359-361.
 20. Poyer, J.L., and P.B. McCay, 1971. Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **246**, 263-269.
 21. Pryor, W.A., 1966. *Free radicals*. McGraw-Hill Book, New York.
 22. Pryor, W.A., 1976a. *Free radicals in Biology*. Vol. I. Academic Press, New York.
 23. Pryor, W.A., 1976b. *Free radicals in Biology*. Vol. II. Academic Press, New York.
 24. Saunders, C.A., S.J. Sogin, D.B. Kaback, and H.O. Halvorson, 1975. Regulation of transcription in yeast; in *Control Mechanism*. Eds., Plenum Press, New York, pp. 21.
 25. Stewart, P.R., 1975. Quantitative assay of DNA in cells and subcellular fractions; in *Methods in Cell Biology*. Vol. XII. Academic Press, New York. pp. 122-123.
 26. Swartz, H.M., 1979. In *Submolecular Biology and Cancer Symposium 67*, pp. 107-130. *Excerpta Medica*, Amsterdam.
 27. Szent-Györgyi, A., I. Isenberg, and S.L. Baird, 1960. On the electron donating properties of carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1444-1449.
 28. Vanin, A.F., and R.M. Nalbandyan, 1966. Free radical states with the localization of the unpaired electron on the S atom in yeast cells. *Biofizika* **11**, 178-179.
 29. Vithayathil, A.J., J.L. Ternberg, and B. Compton, 1965. Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis. *Nature* **207**, 1246-1249.
 30. Wickerham, L.J., 1951. Taxonomy of yeasts in *Tech. Bull. U.S. Dept. Agric.* pp. 1029.
 31. Williamson, D.H., and A.W. Scopes, 1960. The behavior of nucleic acids in synchronously dividing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell. Res.* **20**, 338-348.
 32. Williamson, D.H., and A.W. Scopes, 1961. The Distribution of nucleic acids and proteins between different sized yeast cells. *Exp. Cell. Res.* **24**, 151-153.
 33. Williamson, D.H., and A.W. Scopes, 1962. A rapid method for synchronizing division in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **193**, 256-257.
 34. Yamazaki, I., 1971. One-electron and two-electron transfer mechanisms in enzymic oxidation-reduction reactions. *Adv. Biophys.* **2**, 33.
 35. Zannoni, V., M. Lynch, S. Goldstein, and P. Sato, 1974. A rapid micromethod for the determination of Ascorbic acid in plasma and tissues. *Biochem. Med.* **11**, 41-48.

(Received Jan. 23, 1988)