

³²P-Labeled *Chlorella* 의 正常培地에 있어서의 ³²P 및 Total P 의 轉換

李 永 祿 · 陳 平
(高麗大學校 · 理工大學 · 生物學科)

Turnover of ³²P and Total P in ³²P-labeled *Chlorella* Cells in a Standard "Cold" Medium.

Lee, Yung Nok and Chin, Pyung
(Dept. of Biology, Korea University)

Abstract

1. Uniformly ³²P-labeled *Chlorella* cells were further grown in a standard "cold" medium and aliquots of the algal cells 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 constituents.
2. When the ³²P-labeled algae were grown in a normal "cold" medium, the P-contents in the fractions of DNA and protein increased. In the meantime the ³²P in acid-insoluble polyphosphate fraction decreased considerably, while that in RNA-polyphosphate complex significantly increased.
3. It was inferred that, under the experimental conditions of the present study, the phosphorus in polyphosphate seems to be transferred to RNA polyphosphate complex and the phosphorus used in the synthesis of DNA and protein was, directly or indirectly, taken from those fractions above.

緒 論

Winterman (1955)은 *Chlorella* 細胞에서 無機磷酸이 poly 磷酸으로 轉換되는 것을 觀察하였고 Nihei (1957)는 이러한 polyphosphate가 protein으로 轉換되는 것을 觀察하였는데 近年의 Miyachi (1961) 등의 研究는 이러한 事實을 더욱 明白히 하였다.

한편 Correll (1962, 1964, 1965)들은 *Chlorella*에서 RNA-polyphosphate complex를 分離하여 그 物理化學의 性狀을 究明하고 *chlorella* 細胞에는 相當量の RNA-polyphosphate complex가 存在함을 明白히 하였다.

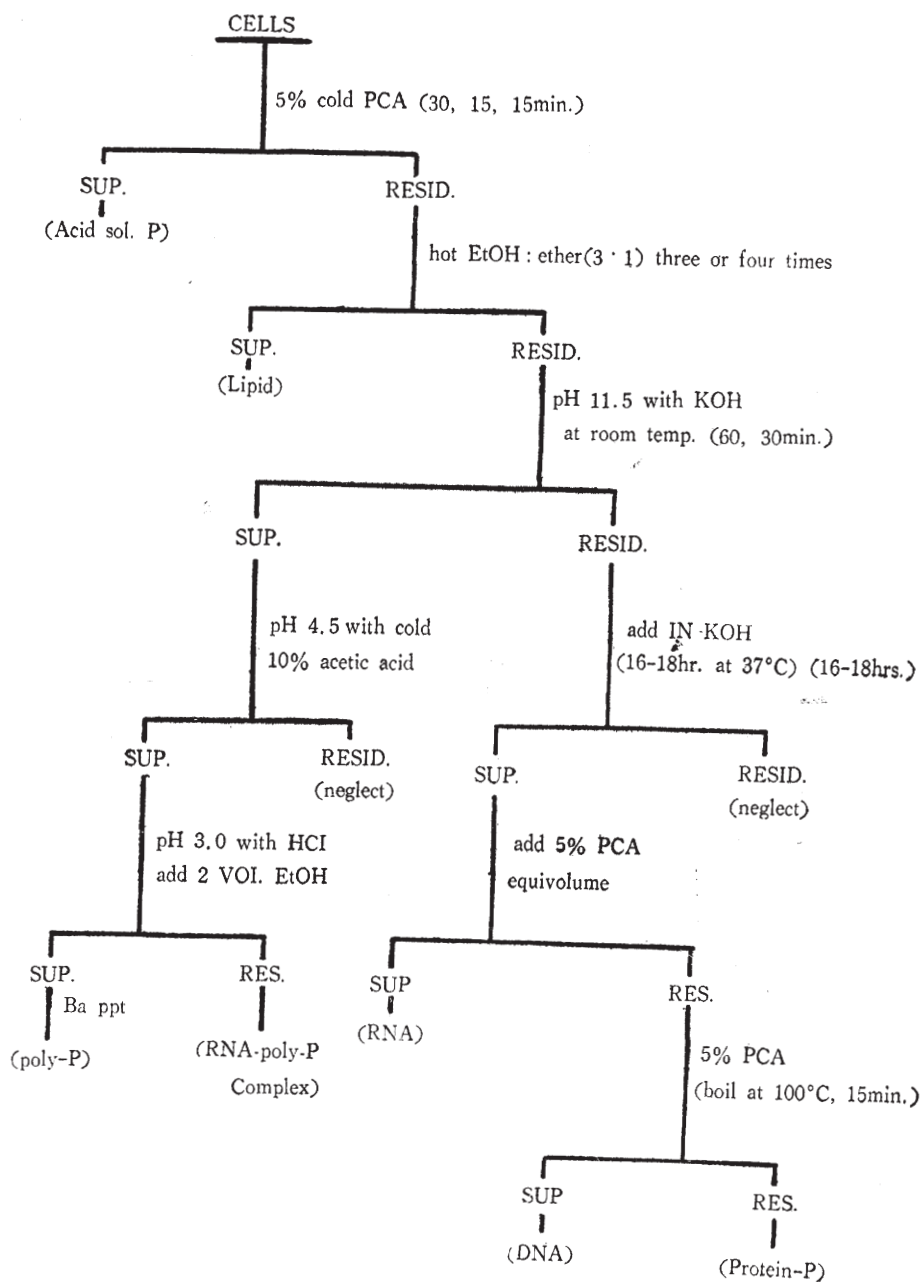
그러나 *Chlorella* 細胞의 磷酸代謝에 있어서의 RNA-polyphosphate의 役割과 다른 poly 磷酸과의 相互作用에 對해서는 觀察된 바가 거의 없다.

本 研究에서는 ³²P로 均等히 label한 *Chlorella*를 正常的인 "Cold" 培地에서 培養하는 동안 形成되는 細胞內的 여러가지 磷酸化合物의 量的 變化를 특히 RNA-polyphosphate complex를 中心으로 調査하여 *Chlorella*의 磷酸代謝에 있어서의 그 役割을 追跡하였다.

材料 및 方法

*Chlorella ellipsoidea*를 0.2 mc/L의 ³²P-phosphate

Table 1. Fractionation of phosphate compounds in *Chlorolla*



를 포함하는 無機培地に 接種하여 25°C에서 6日間前(Lee, 1964)과 같은 方法으로 培養하였다.

細胞의 重量이 接種時의 約 15 倍에 達하였을 때 細胞를 收穫하여 0.002M의 K_2SO_4 溶液으로 세번 씻은 후 一定量の 細胞를 正常的인 "Cold" 培地に 接種하고 培養하였다.

接種時와 培養의 中間期에 一定量の 細胞를 收穫하여 表 1 과 같은 順으로 分割하였는데 核酸의 分離는 Schmidt and Thannhause (1945)法에 依據하였고 RNA-polyphosphate complex의 分離는 Correll and Tolbert (1962)의 方法을 採했다.

磷酸化合物의 各 fraction의 ^{32}P 의 量은 그들의 放射能을 測定하여 培養液의 ^{32}P 의 比放射能으로부터 算出하였고 total-P의 量은 各 fraction의 磷酸化合物을 H_2SO_4 로 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske and Subbarow (1925)法으로 測定하였다.

實驗 結果

正常的인 "Cold" medium에서 培養하는 동안에 일

어난 細胞溶量의 增加는 Fig. 1에 表示하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 培養液中的 細胞溶量의 增加는 50時間 後에는 接種時의 約 7 倍에 達하였다.

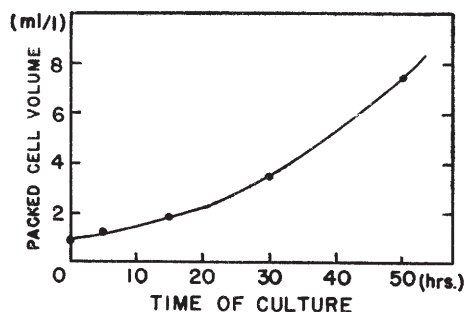


Fig. 1. Changes in packed cell volume during the culture of *Chlorella* cells in the standard "cold" medium.

表 2는 ^{32}P 로 미리 label한 *Chlorella* 細胞를 "Cold" 標準培地에서 培養하는 동안에 일어난 細胞內 各種 磷酸化合物의 ^{32}P 및 Total-P의 量的變化를 表示한 것이다.

Table 2: Amounts of ^{32}P and total-P in each fraction of *Chlorella*.

Sample	Time of culture (hr.)	^{32}P (μ mole/L)	Total - (μ mole/L)	UV-absorbance 260
PCA-soluble total-P	0	4.68	4.32	
	5	8.81	11.40	
	15	9.34	14.82	
	30	9.67	42.57	
	50	11.59	82.00	
Ortho-P	0	0.95	1.59	
	5	0.81	1.61	
	15	0.86	2.59	
	30	0.77	4.72	
	50	0.80	9.99	
Acid-sol. nucleotidic 10 P	0	0.65	0.87	
	5	0.91	0.92	
	15	0.78	1.96	
	30	2.17	5.07	
	50	2.75	12.80	
Lipid-P	0	17.94	17.02	
	5	18.09	21.75	
	15	20.57	35.82	
	30	21.31	49.67	
	50	27.02	89.50	
Acid-sol. poly-P	0	0.36		
	5	0.37		
	15	0.41		
	30	1.27		
	50	1.69		
Acid-insol. poly-P	0	27.63		
	5	10.31		
	15	5.37		
	30	3.98		
	50	1.85		

RNA-poly-P complex	0	19.59	18.26	
	5	34.35	37.00	
	15	37.97	52.91	
	30	40.95	75.25	
	50	47.62	92.50	
RNA	0	42.07	42.77	58.40
	5	36.16	45.06	104.20
	15	38.92	60.06	160.08
	30	47.07	96.57	209.41
	50	48.21	205.89	543.00
DNA	0	3.86	3.50	5.38
	5	4.10	4.20	6.52
	15	7.97	8.42	9.69
	30	8.94	11.02	12.64
	50	7.71	18.20	18.81
Protein	0	0.58	0.59	1.82
	5	1.02	1.17	1.84
	15	1.00	1.53	2.86
	30	1.45	3.18	4.99
	50	2.78	8.37	5.01

Labeled *Chlorella*의 "Cold" medium에 있어서의培養過程에서 lipid 및 acid soluble fraction의 ^{32}P 및 total-P의 含量的變化를 Fig.2에 表示한다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 lipid fraction과 acid soluble fraction의 total-P의 量은 培養時間이 經過함에 따라 현저히 增加하였으나 ^{32}P 의 量은 큰 變動이 없었다.

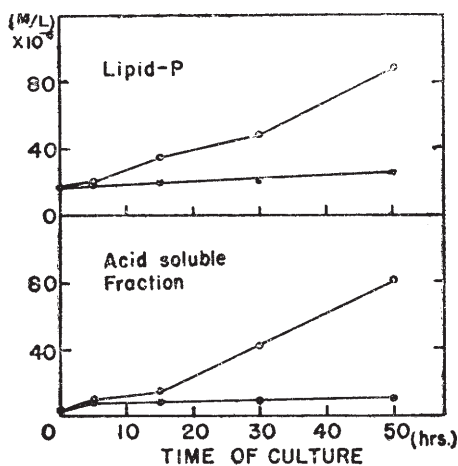


Fig. 2. Changes in amounts of ^{32}P and total P in the lipid and acid soluble fractions of *Chlorella* cells which had been precultured in ^{32}P -containing medium and later grown in a "cold" medium. Solid circle, ^{32}P ; open circle, total P.

Fig.3은 培養過程에 있어서 acid insoluble polyphosphate, acid soluble polyphosphate 및 Orthophosphate fraction의 ^{32}P 및 total P의 量的變化를 表示한다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 acid insoluble polyphosphate fraction의 ^{32}P 는 培養時間이 經過함에 따라 急激히 減少하였는데 acid soluble polyphosphate fraction에 있어서는 多少 增加하였다. Orthophosphate fraction의 ^{32}P 의 量은 培養過程을 通해서 약간 減少하였고 total P의 量은 점차 增加하였다.

Fig. 4는 "Cold" 標準培地에서 培養하는 동안에 일어난 RNA 및 RNA-polyphosphate fraction의 ^{32}P 및 total-P의 量的變化를 表示한다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 RNA fraction의 ^{32}P 의 量은 培養期間中 큰 變動이 없었으나 total-P의 量은 현저히 增加하였고 RNA-polyphosphate의 ^{32}P 의 量은 培養初期에 현저히 增加하여 培養時間이 經過함에 따라 점차로 增加하였고 total-P의 量도 현저히 增加하였다.

"Cold" 標準培地에 있어서의 培養過程에서 nucleotidic libile, DNA 및 protein fraction의 ^{32}P 및 total P의 含量的變化를 Fig. 5에 表示한다. Fig. 5에서보는 바와 같이 nucleotidic libile fraction의 ^{32}P 의 量은 培養期間中 多少 增加하였고 total-P의 量도 현저히 增加하였다. 또 DNA 및 protein fraction에 있어서 ^{32}P 의 量은 培養時間이 經過함에 따라 상당히 增加하였는데 total-P의 量도 30時間까지는 거의 ^{32}P 의 增加와 一致하였고 그후에 현저히 增加하였다.

Fig. 6은 培養過程에 있어서 RNA, DNA 및 RNA-polyphosphate fraction의 紫外部 吸收物質의 量的變化를 表示하였다. RNA 및 DNA fraction에

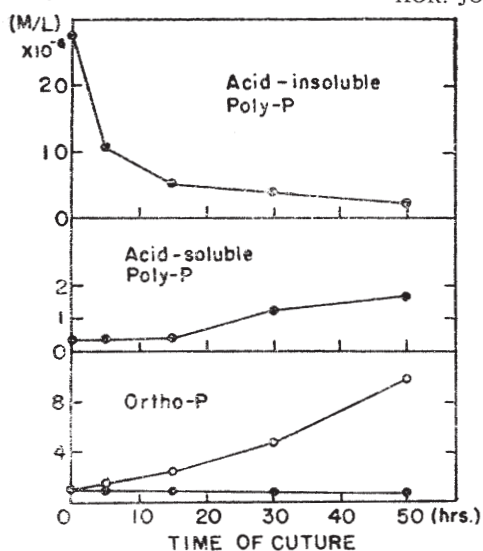


Fig. 3. Changes in amounts of ^{32}P in the acidsoluble polyphosphate and acid-insoluble polyphosphate fractions and in amounts of ^{32}P and total P in the orthophosphate fraction of *Chlorella* cells, during the culture of labeled *Chlorella* in a "cold" medium. Solid circle, ^{32}P ; open circle, total P.

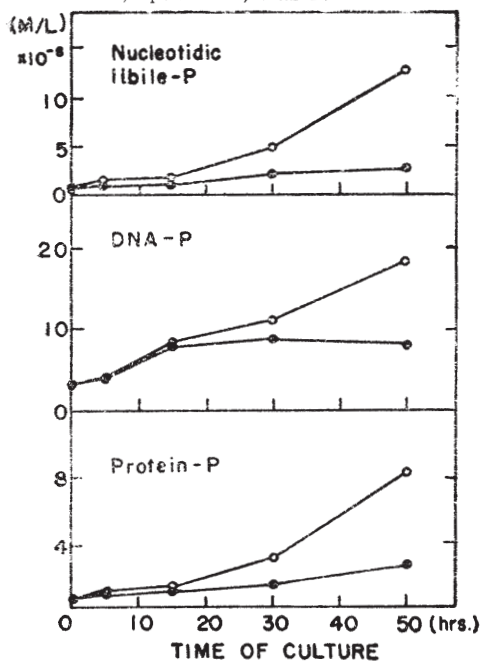


Fig. 5. Changes in amounts of ^{32}P and total P in the nucleotidic labile, DNA and protein fractions of *Chlorella* cells, during the culture of labeled *Chlorella* in a cold medium. Solid circle, ^{32}P ; open circle, total P.

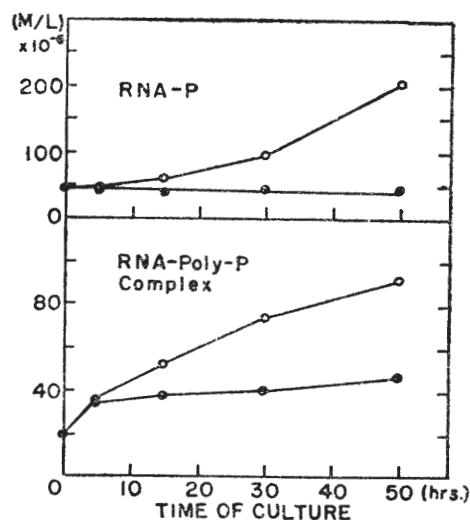


Fig. 4. Changes in amounts of ^{32}P and total P in the RNA-polyphosphate complex fractions of *Chlorella* cells which had been precultured in ^{32}P -containing medium and later grown in a "cold" medium. Solid circle, ^{32}P ; open circle, total P.

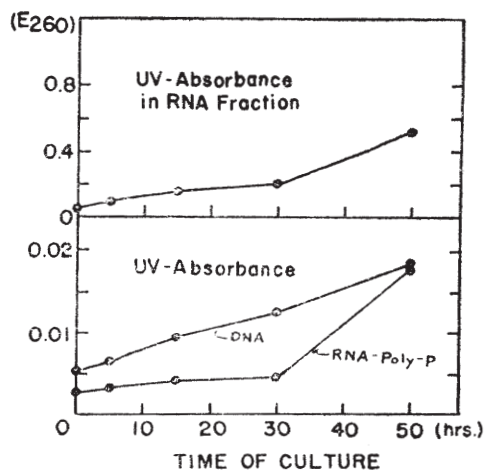


Fig. 6. Changes in amounts of UV-absorbing material in the RNA, DNA and RNA-polyphosphate complex fractions of *Chlorella* cells, during the culture of labeled *Chlorella* in a "cold" medium.

있어서의 紫外部吸收物質은 total-P의 增加와 비슷한 값을 나타내었으나 RNA-polyphosphate complex fraction에 있어서는 그의 높은 P 함유에도不拘하고 紫外部吸收物質의 量은 대체로 적었으며 30時間以後에 急激한 增加를 나타 내었다.

考 察

Belozersky, Kulayer 및 Zaitseva 등 (1957, 1957, 및 1960)의 共同研究者들은 *Aspergillus*와 *Azotobacter*에서 RNA-polyphosphate complex를 分離해 내고 RNA와 polyphosphate 사이에 化學的 結合이 이루어져 있을 뿐만 아니라 細胞內 ^{32}P -phosphate는 acid-insoluble RNA-polyphosphate로 急速히 轉換됨을 觀察하였고 correll 등(1962, '64, '65)은 *Chlorella*에서 RNA-polyphosphate를 分離하여 *Chlorella*細胞에는 RNA-polyphosphate가 相當한 量으로 存在함을 밝혔다.

*Chlorella*細胞를 正常的인 "Cold" medium에서 培養한 結果 RNA-polyphosphate fraction의 ^{32}P 의 量은 (培養時間이 經過함에 따라) 현저히 增加한 反面 acid-insoluble polyphosphate fraction에 있어서는 현저히 減少하였는데, 이러한 結果는 ^{32}P -phosphate가 acid-insoluble polyphosphate로 부터 RNA-poly-

phosphate로 轉換되었으리라는 推測을 可能케 한다

한편 DNA 및 protein-P의 量도 polyphosphate의 減少에 隨伴하여 현저히 增加하였는데, 이러한 結果는 polyphosphate의 P가 DNA 및 protein-P로 轉換된다는 從來의 見解(Lee, Y.N 1964)와 完全히 一致된다.

Miyachi 등(1961)은 *Chlorella*細胞에서 polyphosphate가 生理적으로 P-reservoir로서의 役割을 한다 고 報告한바 있으나 RNA-polyphosphate complex가 metachromasy의 反應을 나타낸다는 correll(1964)의 報告와 Lee 등(1966)의 磷酸缺乏 細胞에 있어서의 RNA-polyphosphate complex의 量的減少를 追跡한 實驗 및 本實驗에서 보는 正常培地에 있어서의 酸不溶性 polyphosphate로 부터의 RNA-polyphosphate complex로의 磷酸의 轉換등을 아울러 生覺할 때 *Chlorella*細胞의 final P-reservoir는 RNA-polyphosphate complex이며 이것이 volutin granule의 구성成分이 되리라는 것을 쉽게 推測할 수 있다.

따라서 正常的인 *Chlorella*細胞內의 RNA-polyphosphate Complex는 酸不溶性 Polyphosphate로부터 形成되며 細胞환경에 따라서는 相互 轉換이 일어나고 間接적으로 DNA 및 protein의 合成에 關與하는 P-reservoir로 생각된다.

報 文

1. ^{32}P 로 均等히 label한 *Chlorella*를 正常的인 "Cold" medium에 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 ^{32}P 및 total P의 含量을 測定하였다.

2. 正常的인 "cold" medium에서의 培養에서 DNA 및 protein fraction의 P의 含量은 增加하였다. 동시에 acid-insoluble polyphosphate의 ^{32}P 의 量은 현저히 減少하였고 RNA-polyphosphate complex의 ^{32}P 의 量은 현저히 增加하였다.

3. 따라서 *Chlorella*細胞內에서 polyphosphate의 phosphate는 RNA-polyphosphate complex로 轉換되기도 하는 한편 이들 fraction으로 부터의 phosphate가 直接 또는 間接으로 DNA 및 protein의 合成에 利用되는 것으로 생각된다.

References

- 1) BELOZERSKY, A.N. and I.S. KULAEV, 1957. Polyphosphates and their significance in the development of *Aspergillus niger* Biochem. (Russia), 22, 27-36. (English translation).
- 2) CORRELL, D.L. and N. E. TOLBERT, 1962. Ribonucleic acid-polyphosphate algae. I. Isolation and physiology. Plant Physiol., 37, 627-636.
- 3) _____ 1964. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. II. Physical and chemical properties of the isolated complexes. Plant & Cell Physiol., 5, 171-191.
- 4) _____, 1965. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. III. Hydrolysis studies. Plant & Cell Physiol., 6, 661-669.

- 5) FISKE, C.H. and Y. SUBBAROW, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**, 375.
- 6) KULAYEV, I.S. and A.N. BELOZERSKY, 1957
A study of the physiological role of polyphosphates in the development of *Aspergillus niger*, using radiophosphorus (^{32}P) Biochem. (Russia), **22**, 545-554. (English translation).
- 7) LEE, Y.N., 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella*, with special reference to polyphosphate. Kor. Microbiol., **2**(1), 1-11.
- 8) LEE, Y.N and U.S. SHIM 1966, Turnover of ^{32}P in ^{32}P -labeled *Chlorella* cells in a P-free medium accepted. Kor. J. Bot. **9**(1).
- 9) MIYACHI S. and H. TAMIYA, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. Plant & Cell Physiol., **2**, 405-414.
- 10) NIHEI, T., 1957 A phosphorylative process, accompanied by photochemical liberation of oxygen, occurring at the stage of nuclear division in *Chlorella* cells. II. J. Biochem. (Tokyo) **44**, 398-396
- 11) SCHMIDT, G. and S.J. TANNHAUSER, 1945. A method for determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. J. Biol. Chem., **161**, 93-99.
- 12) WINTERMANS, J.F.G.M., 1955. Polyphosphate formation in *Chlorella* in relation to photosynthesis. Mededel. Landbouwhogeschool Wageningen, **55**, 69-126.
- 13) ZAITSEVA, G.N., A.N. BELOZERSKY and L. YU. FROLOVA 1960. Oxidative phosphorylation and synthesis of polyphosphate in the cells of *Azotobacter vinelandii*. Cited in Correll et al. PlantPhysiol, **37**, 627~636