

Chlorella Mitochondria 의 Oxidative Phosphorylation 에 對한 Ascorbic Acid 및 IAA 의 作用性에 關하여¹⁾

李 永 祿 · 陳 平

(高麗大學校 理工大 生物學科)

Action of Ascorbic Acid and Indoleacetic Acid on the Oxidation
of Succinate and Coupled Phosphorylation in Chlorella Mitochondria.

Lee, Yung Nok and Chin, Pyung

(Department of Biology, Korea University)

(1964. 6. 13. 受理)

ABSTRACT

Lee, Yung Nok and Chin, Pyung (Dept. of Biology, Korea University, Seoul, Korea) :
Action of ascorbic acid indoleacetic acid on the oxidation of succinate and coupled phosphorylation in *Chlorella* mitochondria. Kor. Jour. Microbiol., Vol. 2, No. 1 p 12-16 (1964)

Mitochondria were isolated from *Chlorella ellipsoidea* and the action of ascorbic acid and indoleacetic acid on the succinate oxidation and coupled phosphorylation in mitochondria suspension were examined.

Oxidation of succinate used as substrate, and phosphorylation coupled to oxidation were strikingly enhanced by the addition of ascorbic acid, while in case of indoleacetic acid it were a little.

In a view of phosphorylative efficiency, P/O ratio resulting from the addition of ascorbic acid was decreased and it may be considered as the result of a partial oxidation of ascorbate in mitochondria.

緒 論

生體에 必要不可缺한 作用物質로서 알려져 있는 vitamine 이나 hormone 等の 作用機作에 關해서는 近年에 여러가지 새로운 事實들이 밝혀져 가고 있으나(9,10,16) 아직도 그 作用機構가 不分明한 것이 많다.

한편 細胞分割法의 發達과 더불어 細胞內의 여러 가지 顆粒의 生理的인 機能이 점차로 밝혀져 가고

있는데(5,11,15) 細胞의 生理的 機能이 이러한 顆粒에 如何히 分擔되어 있는가 하는 것을 究明하는 것은 극히 重要的인 일이다. 磷酸代謝는 物質代謝의 中軸을 이루는 것으로 생각 할 수 있고 mitochondria 는 呼吸의 中軸이라고도 할 수 있다.

이러한 觀點에서 特定된 vitamine 이나 hormone 이 物質代謝의 過程에서 어떠한 具體的인 機能을 나타내게 되는가 하는 것을 究明하기 위하여 mitochondria 를 細胞에서 分離하여 cell free-system 에

- 1) This work was supported in part by a grant made by the Ministry of Education of Korea.
Abbreviations: Tris, tris(hydroxymethyl) aminomethane; ADP, ATP, adenosine di-, triphosphate; EDTA, ethylenediamintetraacetate; DPN, diphosphopyridine nucleotide or nicotinamide-adenine dinucleotide; DPNH, reduced DPN; PN, pyridine nucleotides or nicotinamide nucleotides.
- 2) The medium contained the following per liter: KNO₃, 5g; MgSO₄, 2.5g; KH₂PO₄, 1.25g; M/100 FeSO₄ sol., 1 ml and Arnon's "A₅" (1) sol., 1ml.

있어서의 呼吸 및 oxidative phosphorylation 에 미치는 ascorbic acid 및 indoleacetic acid 의 作用性을 調査한 結果 몇가지 所見을 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

Mitochondria 의 分離 및 精製

Chlorella ellipsoidea 를 培養하여 그 mitochondria 를 分離하였다. *Chlorella* 의 培養은 光度 10 Klux, 溫度 20—25°C 에서 約 5%의 CO₂ 를 包含하는 空氣를 流入시켜 三日間 無機培地²⁾에서 bubbling culture 하였다.

Mitochondria 의 分離는 sucrose media 를 써서 常法에 依하였다. *Chlorella* 를 遠心沈澱시켜 培地로부터 分離한 後 M/500 K₂SO₄ 溶液으로 씻은 다음 蒸溜水로 두번 洗滌하였다. 約 6g 의 *Chlorella* (wet wt.) 를 三倍量의 石英砂와 함께 0.25M sucrose, 0.005M Tris buffer 및 0.005M EDTA 를 包含하는 磨碎液(pH 7.4)으로 0°C 에 維持시킨 Ten-Broeck homogenizer 에서 磨碎하였다. 以下 모든 標品抽出 操作은 0°C 以下에서 行하였다.

Chlorella 1g 當 約 2ml 의 磨碎液을 使用하여 5,000 r.p.m.에서 三分間磨碎한 後 homogenate 의 pH 는 10% NaOH 溶液을 써서 pH7.4 로 다시 調整하였다. Homogenate 를 세정의 cheesecloth 를 通하여 濾過시킨 後 細胞 및 石英砂의 破碎物들을 除去시키기 위하여 Tominaga CM60 Centrifuge 에서 3分間 300G 로 遠心分離하였다. 그 上澄液을 다시 1,500G 에서 10分間 遠心分離하여 chloroplast 를 除

去한 다음 上澄液을 15,000G 에서 20分間 遠心分離하여 沈澱된 粒子를 얻었다.

Mitochondria 는 다시 0.25M sucrose 溶液으로 두번 洗滌한 다음 0.25M sucrose 溶液 0.6ml 當 mitochondria 가 2 μl (packed volume, 15,000에서 20分間)로 包含되게 all glass homogenizer 를 써서 suspension 을 마련 하였다.

Mitochondria 의 檢定은 Janus green B 에 依한 染色法과 osmic acid 固定에 依한 染色處理의 一般의 常法으로 顯微鏡 檢査를 하였다.

呼吸 및 Phosphorylation 의 測定

Oxidative phosphorylation 에 있어서 基質의 酸化와 ascorbate 및 IAA 의 作用에 따르는 酸素消費量은 Warburg(18) manometric method 로 測定하였고 消失된 無機磷의 量은 Fiske-Subbarow 法(6)으로 spectrophotometric method 를 써서 定量하였다.

Warburg vessel 은 準備操作동안 어름속에 두어 冷却狀態를 維持하였고 mitochondria suspension 은 제일 마지막에 加하였다. 反應은 10分間의 溫度平衡을 시킨 다음 side arm 으로 부터 glucose 와 ADP 를 첨가하여 30°C 에서 行하였다. 40分 後에 反應은 冷却된 10% TCA 溶液 1ml 를 急速히 加하여 停止시켰다.

基本反應液은 全容量 3ml 로서 pH7.4 의 Tris buffer, 50mM; 無機磷(Pi), 30μmoles; MgSO₄, 1 mM; ADP, (Na-salt), 0.5mM; Na-succinate, 20mM; glucose, 50mM; Sucrose, 50mM; KF, 50mM 및 2μl (packed volume)의 mitochondria 를 包含하였다. center well 에는 20% KOH 0.2ml 두었다.

Table I. Effect of ascorbic acid and IAA on the oxidation of succinate by *Chlorella* mitochondria

Expt.	Incubation mixture	Substrate	Additions	μl. O ₂ Uptaken/ 40 min./vessel*
1	Complete	Succinate		22.60
	Complete	Succinate	Ascorbate (0.01mM)	32.12
	Complete	Succinate	Ascorbate (0.1 mM)	34.51
	Complete	Succinate	Ascorbate (1 mM)	60.75
	Complete	Succinate	Ascorbate (10 mM)	96.31
2	Complete	Succinate		22.65
	Complete	Succinate	I A A (0.01 mM)	22.76
	Complete	Succinate	I A A (0.1 mM)	23.01
	Complete	Succinate	I A A (1 mM)	28.48
	Complete	Succinate	I A A (10 mM)	30.17

*Vessel contained 2 μl (packed volume) of mitochondria

結果

Succinate를 基質로 한 呼吸連鎖反應에 있어서 ascorbic acid와 indoleacetic acid의 影響은 Table I과 같다. 酸素의 消費量은 ascorbic acid와 IAA의

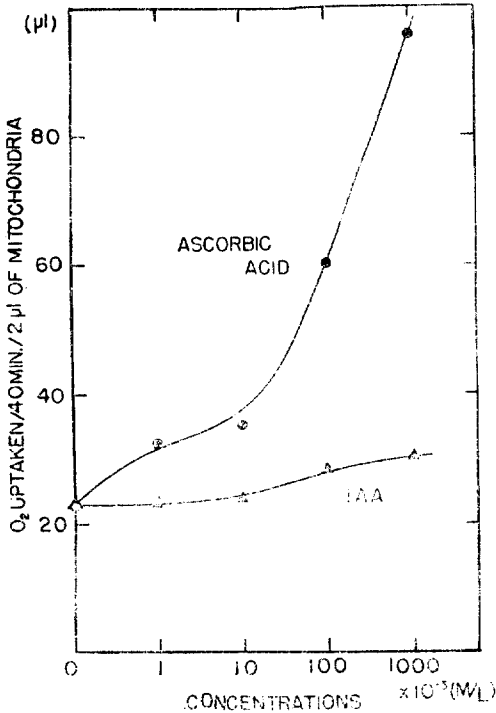


Fig. 1. Effect of ascorbic acid and IAA on the oxidation of succinate by *Chlorella* mitochondria

첨가로 一般적으로 對照群보다 增加하였다.

Table I 및 Fig. 1에서 보는 바와 같이 酸素의 消費量은 첨가된 ascorbic acid와 IAA의 濃度の 增加(0.01 mM—10 mM)에 따라 점차로 增加하였으며 ascorbic acid는 0.1 mM 濃度에서 부터 急激한 增加를 보였다.

같은 濃도에 있어서는 ascorbic acid에 의한 酸素 消費量의 增加가 IAA에 의한 增加보다 현저히 높은 傾向을 나타내었다.

Table II에 oxidative phosphorylation에 미치는 ascorbic acid와 IAA의 影響을 表示한다.

ATP 形成에 起因된 無機磷(Pi)의 消失은 ascorbic acid와 IAA의 첨가에 의해 對照群보다 增加하였고 消費된 酸素의 量과 마찬가지로 첨가된 ascorbic acid와 IAA의 濃度の 增加에 따라 比例적으로 增加하였다. 그러나 ascorbic acid 및 IAA에 起因하는 oxidative phosphorylation의 增加는 酸素消費量의 增加에 比하면 낮은 率을 나타내었다.

即 oxidative phosphorylation의 效率面에서 보면 0.01 mM의 ascorbic acid가 주어졌을때 P/O ratio가 1.70인데 비해 10 mM에 있어서는 1.04로 效率가 減少하고, 0.01 mM의 IAA가 주어졌을때도 P/O ratio가 1.72인데 비해 10 mM에서는 1.61로 減少하였다.

一般적으로 酸化 및 oxidative phosphorylation에 있어서의 酸素消費量과 無機磷의 ester化는 ascorbic acid와 IAA에 의해 促進되었지만 그 效率面에서는 對照群의 P/O ratio인 17.3±1 보다 떨어지고 있

Table II. Effect of ascorbic acid and IAA on *Chlorella* mitochondrial phosphorylation

Expt.	Additions	Uptake of oxygen	Uptake of Pi	P : O
		μatoms/40 min./vessel*	μmoles/40 min./vessel*	
1	Control	1.84	3.20	1.74
	Ascorbate(0.01mM)	2.61	4.64	1.70
	Ascorbate(0.1 mM)	2.80	4.32	1.54
	Ascorbate(1 mM)	4.94	6.60	1.33
	Ascorbate(10 mM)	7.87	8.12	1.04
2	Control	1.84	3.15	1.72
	I A A (0.01mM)	1.85	3.19	1.72
	I A A (0.1 mM)	1.87	3.23	1.72
	I A A (1 mM)	2.31	3.67	1.59
	I A A (10 mM)	2.45	3.94	1.61

* Vessel contained 2 μl (packed volume) of mitochondria

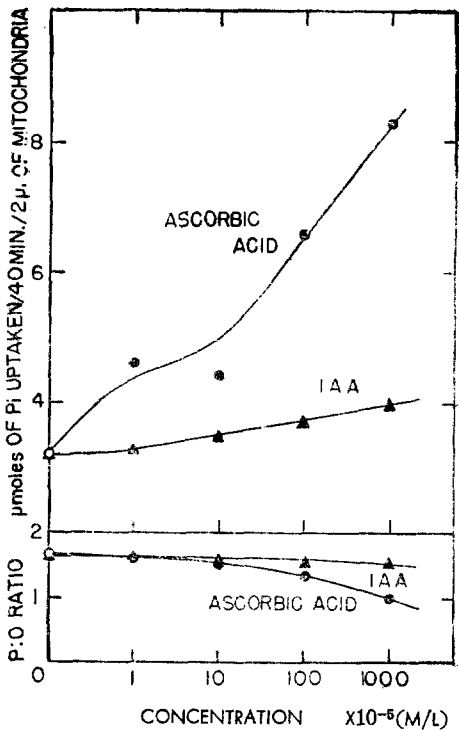


Fig. 2. Effect of ascorbic acid and IAA on *Chlorella* mitochondrial phosphorylation

다. 또 Fig. 2에서 보이는 바와같이 ascorbic acid는 IAA 보다 현저히 末端酸化過程에서 succinate의 酸化 및 oxidative phosphorylation을 增加시키고 있으나 그와 對比하여 P/O ratio는 낮았다.

考 察

本研究에서 succinate의 酸化 및 그 一聯의 酸化過程에 關聯된 磷酸化反應은 ascorbate에 依하여 현저히 增加되었으나 P/O ratio는 若干 低下하였다. Succinate의 酸化와 oxidative phosphorylation에 미치는 ascorbate의 이러한 促進效果는 succinate의 酸化過程에 作用하는 酵素系의 活性이 ascorbate에 의해서 增大된데 基因하는 것으로 생각된다. succinate의 酸化過程에는 succinate와 cytochrome C間에 하나의 phosphorylation step이 있고(7) 다른 하나의 phosphorylation step이 cytochrome C와 O₂間에도 있다. (14), 따라서 succinic dehydrogenase와 cyto-

chrome oxidase의 活性에 對한 ascorbate의 促進效果(8)는 succinate의 酸化 뿐만 아니라 이와 關聯된 磷酸化反應도 促進시킬 수 있었을 것이다.

그러나 이와같은 succinate의 酸化에 수반된 磷酸化反應의 促進에도 不拘하고 P/O ratio가 低下되었다는 것은 反應系內에 다른 形態의 酸化作用이 일어나고 있을 可能性을 提示해 준다. 實際로 mitochondria에서는 ascorbate의 一部分이 극히 낮은 比率이기는 하나 酸化될 수 있고(12, 13) 이러한 ascorbate의 酸化는 磷酸化反應을 同伴하지 않으므로(14) ascorbate의 添加에 依한 P/O ratio의 低下는 이러한 ascorbate 自體의 酸化에도 一因이 있는 것 같다.

Succinate가 呼吸基質로 使用될때 mitochondria에서 PN은 많은 量이 還元된다. (3) 그런데 succinate의 酸化는 pyridine nucleotide와 直接 關聯되지 않는 故로 PN은 어떤 높은 potential을 가지는 system에 의해서 還元되던지 또는 化學的 形態로서 消費된 energy가 DPN의 還元에 使用될 수 있다는 것을 暗示한다. 또한 Azzon(2)은 高 energy phosphate를 枯竭시킨 mitochondria에서 ATP를 첨가하면 succinate의 酸化가 促進됨과 同時에 mitochondria PN의 還元도 併行되어 增加된다고 하였다. 그런데 schachinger(17)는 mitochondria PN의 變化와 磷酸化反應과의 關聯에 對한 研究에서 pyridine nucleotide가 酸化되면서 ATP形成이 急激히 增加되었다고 報告하였다. 따라서 末端酸化過程에 있어서 succinate의 酸化 및 그 一聯의 磷酸化反應은 mitochondria PN의 酸化還元과 關聯하여 呼吸連鎖反應의 한 段階를 거치게 된다고 하겠다.

本實驗의 結果에서 succinate의 酸化 및 이와 關聯된 磷酸化反應이 IAA에 依하여 若干 增加되었음은 DPNH를 酸化하는 酵素의 活性을 增大시키는 IAA의 效果(4)가 作用하였다고 보겠다. 即 IAA의 이러한 促進效果는 succinate의 酸化에 連鎖되어 生成된 mitochondria의 還元된 PN이 酸化되는 것을 促進하고 따라서 磷酸化反應의 增加를 어느程度 招來하였다고 생각된다.

摘 要

1. *Chlorella ellipsoidea*에서 mitochondria를 分離하여 succinate의 酸化와 酸化의 磷酸化反應에 미치는 ascorbic acid와 indoleacetic acid의 作用性を 調査하였다.
2. Succinate의 酸化와 이와 關聯된 磷酸化反應은 ascorbic acid의 添加로 현저히 增大되었으나 indoleacetic

acid의 效果는 대단치 않았다.

3. 磷酸化反應의 效率面에서 보면 ascorbic acid에 의하여 P/O ratio는 현저히 減少되었는데 이는 ascorbate의 一部가 mitochondria에서 酸化될때 基因한다고 생각된다.

REFERENCE

- 1) Arnon, D. I., 1938. Microelements in culture-resolution experiments with high plant. *Am. J. Bot.*, 25, 322-325.
- 2) Azzone, G. E., Ernster, L., & Klingenberg, M., 1961. Cited in Azzone, Demonstration of a requirement of high energy phosphate for the aerobic oxidation of succinate in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 236, 1518.
- 3) Birt, L. M., & Bartley, W., 1960. The pyridine nucleotide metabolism of mitochondria incubated with and without added substrates and metabolic inhibitors. *Biochem. J.*, 76, 427-438.
- 4) Chance, B., 1954. Enzyme mechanisms in living cells. In : A symposium on the mechanism of enzyme action. McElroy, W. D. & Glass, B., eds. The Johns Hopkins Press, Baltimore, p 399-460.
- 5) Chance, B., Garfinkel, D., Higgins, J., & Hess, B., 1960. Metabolic Control Mechanisms. V. A solution for the equations representing interaction between glycolysis and respiration in ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 235, 2426-2439.
- 6) Fiske, C. H., & Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol.*, 66, 375-400.
- 7) Greengard, P., Mennaert, K., Slater, E.C., & Betel, I., 1959. Yield of oxidative phosphorylation associated with the oxidation of succinate to fumarate. *Biochem. J.*, 73, 637.
- 8) Harrer, C. J., & King, C. G., 1941. Ascorbic acid deficiency and enzyme activity in guinea pig tissues. *J. Biol. Chem.*, 138, 111.
- 9) Hawtrey, A. O., & Silk, M. H., 1960. Mitochondria of the Ehrlich ascites-tumor cell. Isolation and studies of oxidative phosphorylation. *Biochem. J.*, 74, 21-26.
- 10) Hunter, F.E., Jr., Levy, J.F., Fink, J., Schuts, B., Guerra, F., & Hurwits, J.A., 1959. Studies on the mechanism by which anaerobiosis prevents swelling of mitochondria in vitro: Effect of electron transport chain inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 234, 2176.
- 11) Jackson, P.C., Hendricks, S.B., & Vasta, B.M., 1962. Phosphorylation by barley root mitochondria and phosphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.* 37, 8-17.
- 12) Legninger, A.L., UL Hassan, M., & Sudduth, H.C., Phosphorylation coupled to the oxidation of ascorbic acid by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 219, 911.
- 13) Maley, G.F., & Lardy, H.A., 1954. Phosphorylation coupled with the oxidation of reduced cytochrome C. *J. Biol. Chem.*, 210, 903.
- 14) Morrison, M., Hollocher, T., & Stotz, E., Cited in Morrison, Biological oxidation. *Ann. Rev. Biochem.*, 30, 11-44.
- 15) Packer, L., 1960. Metabolic and structural states of mitochondria. 1. Regulation by adenosine diphosphate. *J. Biol. Chem.*, 235, 242.
- 16) Price, C.A., 1955. Cited in Hackett, Recent studies on plant mitochondria. *Internal. Rev. Cytol.*, IV, 143-195.
- 17) Schachinger, L., Eisenhardt, R., & Chance, B., 1961. Cited in Morrison, Biological oxidation. *Ann. Rev. Biochem.*, 30, 11-44.
- 18) Umbreit, W.W., Burris, R.H., & Stauffer, J. F., 1957. Manometric techniques. Rev. Ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn.