

## Chlorella 의 生理的, 生化學的 諸活性에 미치는 $\gamma$ -線의 影響<sup>1)</sup>

李 永 祿  
(高麗大學校 · 理工大學 · 生物學科)

(1964. 7. 15. 受理)

### ABSTRACT

LEE, Yung Nok (Dept. of Biology, Korea University) Effects of Cobalt-60  $\gamma$ -ray irradiation on the physiological and biochemical activities of *Chlorella*. Kor. J. Bot., VII(3): 9-14, 1964

The sensitivities of *Chlorella ellipsoidea* to  $\gamma$ -ray from Cobalt-60 were determined by measuring the photosynthetic and respiratory activities and the changes in phosphate contents in various fractions of the irradiated cells, which were further grown in a standard medium after irradiation, were compared to those of non-irradiated normal cells.

The photosynthetic and respiratory activities of the cells were almost inversely proportional to the dose of  $\gamma$ -ray irradiated and the photosynthetic activity was more sensitive than the respiratory activity of the cells. The most sensitive to  $\gamma$ -ray was growth activity, followed by photosynthesis, exogenous and endogenous respirations of the cells in decreasing order.

*Chlorella* cells were so resistant to  $\gamma$ -ray compared with other organisms that about 280,000 r dose of  $\gamma$ -ray irradiation was necessary to reduce as much as half the subsequent photosynthetic activity.

When the irradiated algae were further cultured in a standard medium, the phosphate contents in the fraction of DNA, RNA and phosphoprotein decreased considerably compared with those of non-irradiated normal cells, while the phosphate contents in the fraction of polyphosphates increased than those of control.

Therefore, it was deduced that  $\gamma$ -ray inhibited the synthesis of DNA from polyphosphates, that the synthetic activities of RNA and protein were decreased owing to either these indirect effect on DNA synthesis or the direct effect of  $\gamma$ -ray itself, and that the growth of *Chlorella* cells were consequently retarded.

### 緒 論

細菌이나 菌類의 增殖, 呼吸 등 生理的 活性에 미치는 放射線의 影響을 斷片的으로 報告한 바 있으나<sup>(1)(2)</sup> 放射線에 대한 細胞의 生理的 諸活性의 感受差를 molecular pattern에서 比較究明함이 아쉬웠다.

比較的 少量의 線量에 의해서도 어느기간 동안 細胞分裂이 지연되어 生長이 阻害되는 現象은 널리 觀察되고 있는 事實인데 磷酸化合物은 生長의 內的要因이라고도 볼수 있는 物質代謝의 中軸의 役割을 담당하고 있다. 따라서 磷酸代謝에 미치는  $\gamma$ -線의 影響을 究明함은 細胞의 生長障害에 대해 중요한 열쇠를 제공해 줄지도 모를 일이다.

이러한 觀點에서 *Chlorella*를 使用하여 綠藻의 光合成, 呼吸, 生長 등에 미치는 電離放射線의 影響을 조사하고, 細胞의 物質代謝에 미치는 影響과 比較코져 磷酸化合物 特히 DNA, RNA, 및 phosphoprotein 등의 合成能에 미치는 影響을 조사하였다.

本研究에 諸般의 便宜를 제공하여주고 여러모로 돌보아 주신 東京大學, 應用微生物研究所의 長谷葉二, 重地重遠 兩氏와 徳川生物學 研究所의 田宮 博, 森村祐次 諸氏에게 深甚한 謝意를 表한다.

1) 本研究는 東京大學 應用微生物 研究所에서 行한 것이다.

略字: DNA; desoxyribonucleic acid, RNA; ribonucleic acid, TCA; trichloroacetic acid, PCA: perchloric acid,  $\Delta$ 10P; amount of orthophosphate liberated by hydrolysis with 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 10min. at 100°C.

## 材料 및 方法

**實驗材料** 本研究에 使用한 生物材料는 *Chlorella ellipsoidea* 인데 通常의 bubbling culture<sup>(6) (11) (12)</sup> 로 培養하였다.

**갠마線的 照射** *Chlorella* 를 收穫하여 M/500 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液으로 두번 씻은 후 엽은 유리 容器에 넣어 Cobalt-60  $\gamma$ -ray irradiator 內에서 照射하였다. 照射時의 細胞密度는 packed cell volume 0.14~0.18 ml/ml cell suspension 이었고  $\gamma$ -線의 強度는 420 r/min. 이었다. 照射直後에 곧 光合成能과 呼吸能의 變化를 測定기록하였다.

**檢壓測定** 細胞의 光合成能과 呼吸能은 Warburg manometer 로 測定하였는데 reaction chamber 의 組成은 각각 Table 1 과 같다. 光合成能의 測定은 飽和光線(約 20,000 lux)으로 계속 照射하고 25°C 에서 測定하였다. 光線下에서 30 分間 계속 測定한 후에는 다시 暗處에서 呼吸으로 消費된 酸素量을 測定하여 이틀로부터 光合成으로 放出한 酸素量을 O<sub>2</sub> 로 計算하였다. 呼吸能의 測定은 前과 같은 方法<sup>(9)</sup>으로 暗處에서 行하였다.

TABLE 1. FLASK CONSTITUENTS FOR THE MANOMETRIC MEASUREMENTS OF PHOTOSYNTHETIC AND RESPIRATORY ACTIVITIES.

FOR THE MEASUREMENT OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITIES	FOR THE MEASUREMENT OF RESPIRATORY ACTIVITIES
Bicarbonate-carbonate mixture (0.1 M K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10%, 0.1 M KHCO <sub>3</sub> 90%) pH range 6.3~7.3 at 25°C. .....4 cc	M/10 Glucose (in side arm) .....0.5 cc 20% KOH (in central cap) .....0.5 cc Phosphate Buffer (pH 5.8) .....3 cc
Cell suspension (PV 0.0246 ml/cc) .....1 cc	Cell suspension (PV 0.145 ml/cc).....1 cc

**磷酸化合物의 分劃** 約 70,000 r 의  $\gamma$ -線에 照射된 細胞는 正常的인 培地에 接種하여 培養하였다. 接種時와 培養의 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 細胞를 分劃하였다. 核酸의 分離는 Schmidt and Thannhauser 法<sup>(15)</sup>에 依據하였고 polyphosphate 의 分離는 Miyachi and Tamiya 法<sup>(13)</sup>을 썼다. 細胞의 處理順序는 먼저 8%의 Cold TCA 로 두번 抽出하여 酸可溶性物質을 分離하고 95% 및 75% ethanol 로 각각 1回, hot ethanol-ether (3:1)로 3回 乃至 4回 抽出하여 lipid 를 分離한 후 cold(dilute) KOH 로 pH 9로 하여 2回 (1時間 및 30分) 抽出한다. 酸不溶性非脂質標品은 다시 dil. KOH 로 37°C 에서 16~18時間 處理하여 沈澱物을 除去하고 上澄液을 PCA 로 中和하여 所謂 poly-p "C"를 共沈시키고, 上澄液에 5% PCA 를 加하여 2.5% 溶液이 되게하여 RNA 를 分離하고 沈澱된 DNA-蛋白質은 5% PCA 에 懸濁하여 15分間 100°C 로 加熱하여 蛋白質을 沈澱시키고 DNA 를 分離한다.

**分析** 各 fraction 의 磷酸化合物을 Kjeldal flask 內에서 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 로 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske and Subbarow 法<sup>(9)</sup>으로 測定하였다. DNA 및 RNA fraction 은 Cary 의 Spectrophotometer 로 紫外部 吸收度를 測定하여 그 値를 磷酸測定値와 比較하여 보았다.

## 結 果

細胞의 光合成能에 미친  $\gamma$ -線의 影響

*Chlorella* 의 光合成에 미친  $\gamma$ -線의 影響을 Table 2, 및 Fig 1, Fig 2. 에 표시한다. Fig 1에서 보는 바와 같이 *Chlorella* 細胞의 光合成能은  $\gamma$ -線의 照射로 減少되었으나 적어도 照射直後의 어느 一定期間 동안에는 그 減少率에 變化가 없었다. 光合成能에 미치는  $\gamma$ -線의 線量效果關係는 Fig. 2에서 보는바와 같이 大體로 線量에 反比例하여 光合成能이 減少되었다. 이러한 實驗條件下에서 *Chlorella* 의 光合成能을 半으로 減少시키는 데는 約 280,000 r 의  $\gamma$ -線의 線量이 所要되며 70,000 r 에서는 約 9%의 減少를 나타낸다.

TABLE 2. EFFECT OF COBALT-60 GAMMA-RAY IRRADIATION ON THE PHOTOSYNTHETIC ACTIVITIES IN *CHLORELLA*.

IRRADIATION		O <sub>2</sub> OUT PUT (CO <sub>2</sub> )	INHIBITION (%)
TIME (hr.)	DOSE (kr.)		
0	control	77.2	0
3	69.7	70.6	8.6
5	116.0	63.2	18.2
7	162.4	53.8	30.4
9	208.8	49.0	36.5
0	control	57.5	0
15	348.0	20.3	46.8

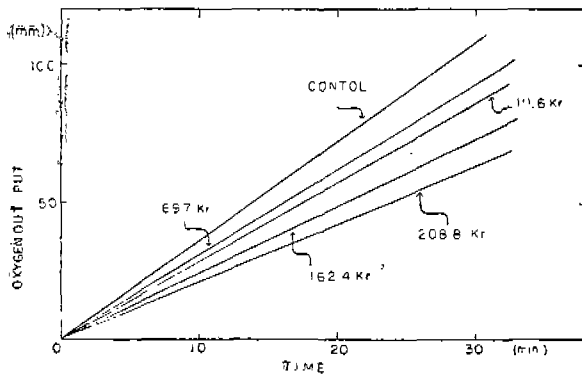


Fig 1. Effect of Cobalt-60  $\gamma$ -ray irradiation upon subsequent photosynthetic Oxygen output of *Chlorella* cells in the light.

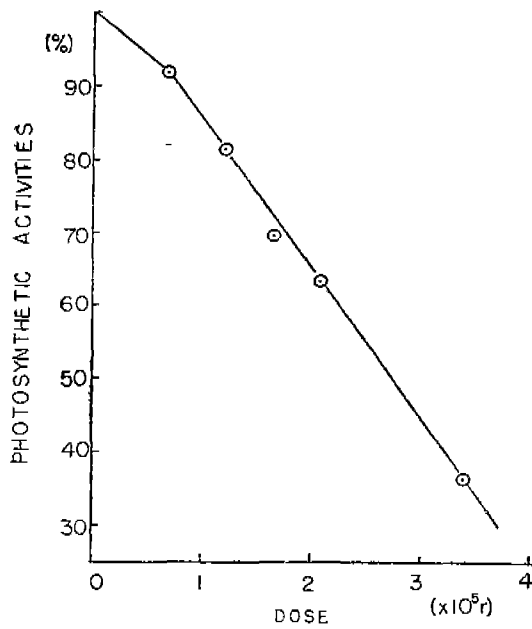


Fig 2. Correlation between the dose of  $\gamma$ -ray irradiated and photosynthetic activities of *Chlorella* cells

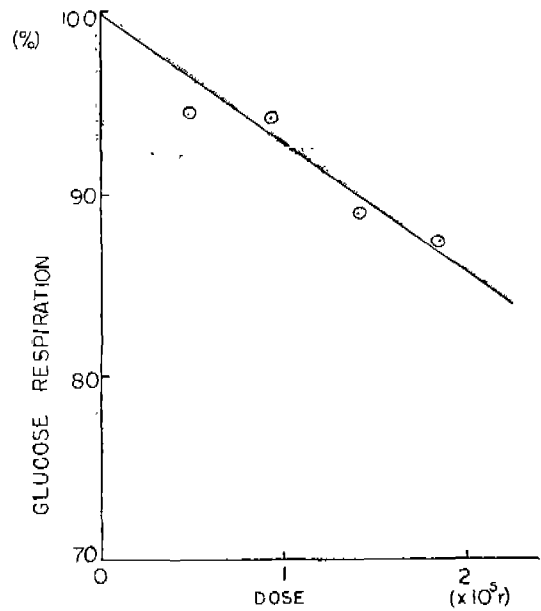


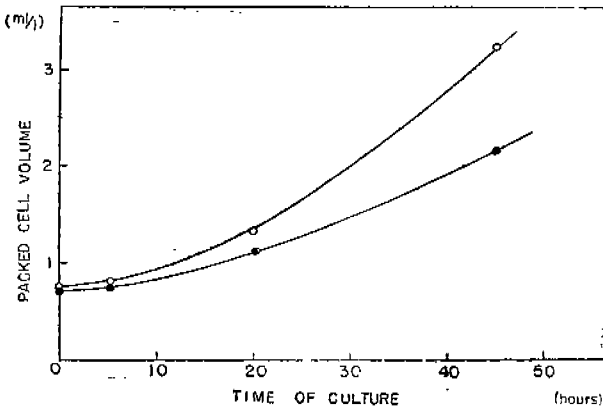
Fig 3. Correlation between the dose of  $\gamma$ -ray and glucose respiration in *Chlorella*.

**Chlorella의 호흡能에 미친  $\gamma$ -線의 影響**

*Chlorella*의 endogenous respiration 및 glucose respiration에 미친  $\gamma$ -線의 影響을 Table 3에 표시하고 glucose respiration에 미친  $\gamma$ -線의 線量效果關係는 Fig. 3에 표시한다. glucose respiration은  $\gamma$ -線의 照射로 減少되었으나 endogenous respiration은 오히려 약간 刺戟되었다. glucose respiration에 미친 線量效果關係는 光合成의 경우나 마찬가지로 線量이 增加함에 따라 大體로 反比例하여 減少되었으나 그 感受性은 光合成能보다도 더 安全하여 70,000 r의 照射로 *Chlorella*의 呼吸能은 約 5%의 減少를 보였다.

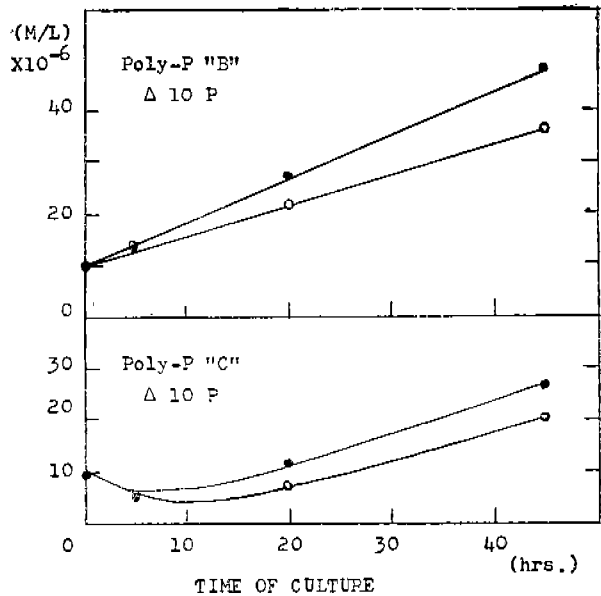
**Table 3. EFFECT OF COBALT-60 GAMMA-RAY IRRADIATION UPON SUBSEQUENT ENDOGENOUS AND GLUCOSE RESPIRATION.**

IRRADIATION		GLUCOSE RESPIRATION		ENDOGENOUS RESPIRATION
TIME(hr.)	DOSE(kr.)	QO <sub>2</sub>	INHIBITION(%)	QO <sub>2</sub>
0	control	6.58	0	1.76
2	46.4	6.21	5.7	2.40
4	92.8	6.20	5.8	3.52
6	139.2	5.85	11.1	2.66
8	185.6	5.76	12.5	3.06



**Fig 4.** Effect of Cobalt-60  $\gamma$ -ray irradiation on the subsequent growth of *Chlorella*. Open circle, control; solid circle, irradiated

**Fig 5.** Effect of Cabalt-60  $\gamma$ -ray irradiation on the changes in polyphosphates contents of growing *Chlorella* cells. Open circle, control; solid circle, irradiated.



***Chlorella*의 磷酸代謝에 미친  $\gamma$ -線의 影響**

約 70,000 r의 放射線에 照射된 *Chlorella* 細胞의 照射後 培養過程에 있어서의 生長差를 Fig. 4에 표시한다. 培養液中の 細胞容量의 增加는  $\gamma$ -線 照射區에 있어서는 45時間 後에는 接種時의 約 3倍에 達하였고 非照射 對照區에 있어서는 接種時의 約 5倍에 達하였다. 따라서  $\gamma$ -線에 對한 *Chlorella* 細胞의 感受性은 生長에 미치는 效果가 가장 銳敏하고 다음이 光合成能이고 呼吸能은 가장 安全하다는 것을 알 수 있었다.

照射後 培養過程에 있어서의 *Chlorella* 細胞의 各 fraction의 P 含量을 分析한 結果 特記할 만한 事實은 對照區에 비해 照射區의 生長은 抑制되었는데도 不拘하고 照射區의 poly-P fraction의 P 含量은 對照區보다도 현저히 增加하였다는 事實이다. Fig. 5와 Fig 6에 각각 poly-P, 및 DNA, RNA, protein의 含量의 變化에 미치는  $\gamma$ -線의 影響을 표시하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 DNA, RNA 및 protein 合成은  $\gamma$ -線의 照射로 현저히 抑制되었다. acid soluble fraction이나 lipid fraction의 total P도  $\gamma$ -線의 照射로 약간의 감소를 보였으나 DNA, RNA 또는 protein fraction에 비하면 대단한 것은 아니었다.

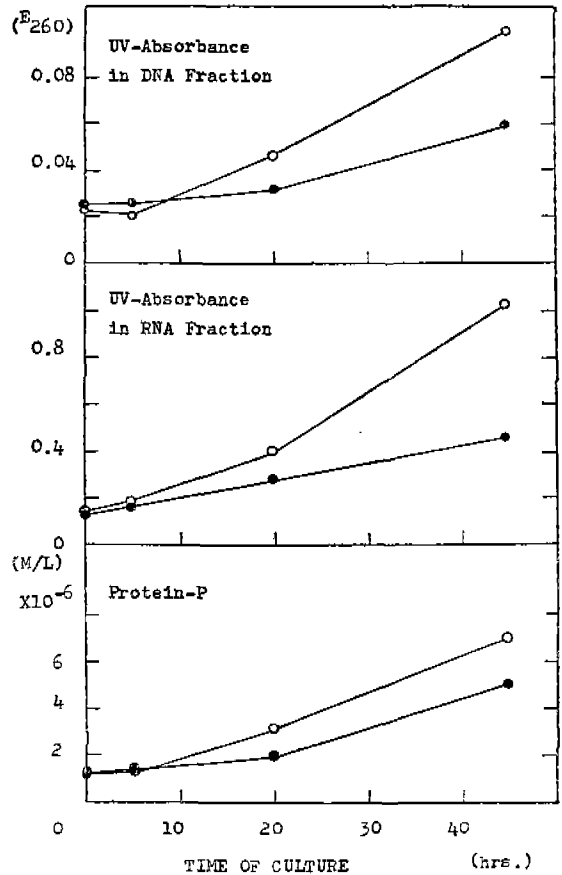


Fig 6. Effect of Cobalt-60  $\gamma$ -ray irradiation on the changes in DNA, RNA and protein contents of growing *Chlorella* cells. Open circle, control; solid circle irradiated.

**考察 및 結論**

$\gamma$ -線에 대한 *Chlorella* 細胞의 感受性은 生長에 미치는 效果가 가장 銳敏하고 다음이 光合成, 呼吸의 順이었다. 呼吸能은  $\gamma$ -線에 대하여 가장 安定된 편이어서 *glucose respiration*은 若干 抑制되었으나 *endogenous respiration*은 相當한 線量의 照射에도 오히려 刺戟을 받았는데 紫外線 照射의 경우에도 비슷한 結果를 나타낸다.<sup>(14)</sup>

*Chlorella*의 磷酸代謝에 미치는 影響도 특히 DNA, RNA 및 protein 등의 合成能에 미치는 影響은 生長에 미치는 영향 못지 않게 敏感하다. 本實驗에서 DNA, RNA, protein 등의 合成은  $\gamma$ -線의 照射로 현저히 抑制되었는데 이는 Cherry<sup>(2)</sup> Ledoux<sup>(7)</sup> 등이 高等植物에서 觀察한 結果와 一致된다.

生細胞內에 있어서의 polyphosphate의 向方에 대하여 Kaltwasser<sup>(6)</sup>는 polyphosphate가 安定한 酸不溶性物質로 轉換된다고 하였고 Miyachi and Tamiya<sup>(13)</sup>는 *Chlorella*에서 polyphosphate가 DNA 및 protein 등으로 轉換된다고 하고 RNA는 培地中の ortho-P에서 形成된다고 하였다. 著者도 <sup>32</sup>P로 均等히 label한 *Chlorella*를 "cold" medium에서 培養하였을때 <sup>32</sup>P-labeled poly-phosphate의 減少와 DNA 및 protein fraction의 <sup>32</sup>P의 增加를 觀察할 수가 있었다<sup>(10)</sup> 따라서  $\gamma$ -線은 poly-P로부터의 DNA의 合成을 抑制하는 것으로 生覺할 수 있다. 이러한 結果는 電離放射線이 Phosphorylation을 抑制한다는 事實<sup>(11)(12)</sup>과도 잘 부합된다.

## 摘 要

1.  $\gamma$ -선에 대한 *Chlorella* 세포의 생장, 광합성, 호흡능 등 여러가지 생리의 활성의感受差를測定하고照射後培養過程에 있어서의 DNA, RNA, Phosphoprotein 등 세포의磷酸化合物合成能에 미치는  $\gamma$ -선의影響을測定하였다.

2. *Chlorella* 세포의  $\gamma$ -선에 대한感受差는 생장에 미치는 효과가 가장銳敏하여比較的 적은線量에 의해서도相當한生長障害를招來하였다. 다음으로銳敏한 것이光合性能이고 glucose respiration, endogenous respiration의順이었다. endogenous respiration은 가장安定된 편이어서 glucose respiration을 약간抑制하는線量에서도 오히려刺戟되었다.

3. 광합성과 호흡능에 미치는線量效果關係는感受差는 있으나 다 같이  $\gamma$ -선의線量에反比例하여線量이增加함에 따라光合成 또는呼吸能은減少하였다. *Chlorella*의光合成能을照射直後에半으로減少시키는데要하는線量은約 280,000 r이所要되었다.

4. 照射後培養過程에서 *Chlorella* 세포의 DNA, RNA, protein fraction의 phosphate含量은對照區에 비해顯著히減少되었으나 polyphosphate fraction의 phosphate含量은 오히려增加하였다. 따라서  $\gamma$ -선은 polyphosphate로부터의 DNA合成을抑制하는 것으로生覺된다. 이는 RNA 및 protein의合成能에도間接的인影響을 미치고 또는  $\gamma$ -선의直接的인影響으로 그合成이抑制되어細胞의生長을阻害하는 것으로生覺된다.

## 文 獻

1. BEYER, R.E., 1959. The effect of UV light on mitochondria. 11. restoration of oxidative phosphorylation with vitamin K, after near ultraviolet treatment. J. Biol. Chem., 234, 688-692.
2. CHERRY, J.H., R.H. HAGEMAN, F.I. COLLINS, and D. PLESHER, 1961. Effects of irradiation on corn seed. Plant Physiol., 36, 566-572.
3. FJSKE, C.H., and Y. SUBBAROW, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66, 375.
4. HALL, J.C., A.L. GOLDSTEIN, and B.P. SONNENBLICK, 1963. Recovery of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after whole body irradiation. ibid., 238, 1137-1140.
5. HASE, E., Y. MORIMURA, and H. TAMIYA, 1957. Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. Arch. Biochem., 69, 149.
6. KALTWASSER, H., 1962. Die Rolle der Polyphosphate im Phosphatstoff-wechsel eines Knallgasbakteriums. Arch., Mikrobiol. 41, 282-306.
7. LFDoux, L., P. GALAND, and R. HUART, 1962. Nucleic acid and protein metabolism of barley seedlings. 111. Effects of X-ray. Rad. Bot., 2, 119-124.
8. LEE, M.J., and Y.N. LEE, 1960. Effects of ultraviolet and nucleic acid derivatives on the reproductive rate of *Azotobacter*. Kor. J. Bot., 3 (2); 1-5
9. LEE, Y.N., 1963. Changes in respiratory activity and the sensitivity to ultraviolet light of *Neurospora* cells at different growing stages. ibid., 6, 59-63
10. Lee, Y.N., 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella*, with special references to polyphosphate. Kor. J. Microbiol., 2, 1-11
11. LEE, Y.N., and P. JIN, 1964. Action of ascorbic acid and indolacetic acid on the oxidation of succinate and coupled phosphorylation in *Chlorella* mitochondria. ibid., 2, 12-16
12. LEE, Y.N., and C.K. KIM 1964. Changes in pigment contents of *Chlorella* cells during the course of their life cycle. Dr. Lee Fui Je's memorial issue. 145-152.
13. MIYACHI, and H. TAMIYA, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. Plant & Cells. Physiol., 2, 405-414.
14. SASA, T., 1961. Effect of ultraviolet light upon various physiological activities of *Chlorella* cells at different stages in their life cycle. Plant & Cell Physiol., 2, 253-270.
15. SCHMIDT, G., and S.J. THANNAUSER, 1945. A method for the determination of desoxiribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. J. Biol. Chem., 161, 83-89.