

微生物의 細胞生理에 미치는 電離放射線의 影響에 關한 研究(第4報)

——酵母菌의 炭水化物代謝에 對한 γ -線의 影響에 對하여——

金 鍾 協
(原子力研究所 生物學研究室)

Studies on the cellular metabolism in microorganisms as influenced by gamma-irradiation. (IV)

“on the carbohydrate metabolism of yeast irradiated by γ -ray.”

Kim, Jong Hyup

(Div. of Biology, Atomic Energy Research Institute, Korea)

Abstract

Studies on the carbohydrate metabolism of yeast as influenced by gamma-irradiation from cobalt -60 have been carried, then the mechanisms of radiation effect on respiration and fermentation were discussed under considerations of permeable changes of irradiated cell membrane.

The cells of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) which had been gamma-irradiated of 240 k.r. doses for an hour, then were put into aerobic oxidation and anaerobic fermentation without substrate.

Total and fractionated carbohydrates of irradiated yeast cells were determined by colorimetric method with anthrone and orcinol reagents, the amounts of total carbohydrate, trehalose, RNA-ribose, PCA-soluble glycogen, alkali-soluble glycogen, acetic acid-soluble glycogen, mannan and glucan were determined according to the course of aerobic oxidation and anaerobic fermentation.

It is found that the carbohydrates of irradiated cells leak out and amount of the losses reaches eleven times more than that of control, the volume of losses are seems to be replaced by water, it can be suggested the damage of gamma-irradiation occurs in the site of passive transport of cell membrane.

The endogeneous aerobic respiration of irradiated cells are increased much more than control, the synthesis of reserve glycogen, glucan and RNA-ribose promoted much more than control. The anaerobic fermentation of irradiated cells are also increased than that of control, but the breakdown of carbohydrate is less than endogeneous respiration of irradiated cells. The synthetic rate is also less than that of aerobic oxidation.

In irradiated yeast cells, trehalose is revealed to be primary substrate for endogeneous carbohydrate metabolism, so it is proved that the enzymic patterns are not changed but the activities of enzymes relating endogeneous respiration and autofermentation is activated.

It is to be considerable to distinguish endogeneous respiration and autofermentation from exogeneous respiration and fermentation on irradiation, for membrane permeability changes and loses out carbohydrate by ionizing radiation.

緒 論

生體細胞에 對한 電離放射線의 影響研究는 微生

物, 植物 및 動物의 癌細胞를 材料로 하여 많이 이루어졌었다. 1950년까지의 初期研究에 關해서는 Hollaender, 1954. 에 依하여 綜說적으로 紹介된 바

있으며 酵母菌에 미치는 放射線의 影響研究에 對해서는 Rothstein, 1959. 에 의하여 綜說化되었다. 그러나 1955 年 以前의 研究는 大部分 X-線과 紫外線을 가지고 實施하였으며 研究目標는 主로 致死現象과 그 photoreactivation 의 問題이었다. (Hollaender, 1954.)

1955 年 以後에는 放射線의 影響研究가 進一步하여 細胞의 代謝機能面에 集中되고, DNA, RNA 의 放射線分解作用의 機作까지도 相當히 많이 밝혀졌었다. (Grosch, 1965., Wolstenholme, 1956.)

其後에 核爆發實驗, 原子爐運轉, 原子力發電, 放射線食品貯藏, 醫藥品殺菌 및 放射性同位元素의 科學, 産業에 있어서의 活潑한 利用 等은 必然的으로 γ -ray 의 生物學的 影響問題를 提起하였으며, 이 γ -ray 의 生物學的 效果를 一層 더 깊이 研究하여야 할 契機를 發生하였다.

따라서 現今에 있어서도 生體細胞에 對한 γ -ray 의 影響研究는 더욱 活潑히 進行되고 있으며, 酵母菌은 細胞生理研究의 好適材料로서 利用되고 있다.

Bair, 1954. 는 酵母의 呼吸作用과 醱酵에 미치는 X-ray 의 影響研究를 한 바 있으며, 磷酸鹽과 p.H. 의 條件이 酵母의 O_2 -uptake 를 크게 支配한다고 하였다. 한편 CO_2 生産(即 醱酵)는 100,000r. 의 X-ray 照射에서도 變動이 없다고 報告하였다.

그 以前에 Sweden 의 Euler, 1942. 等은 酵母의 生理 및 細胞成分에 對한 X-ray 의 影響研究를 實施한 바, 酵母菌의 生殖率, 呼吸, 醱酵率, 核酸含量, phosphatase 活性度, 醱酵에 미치는 colchicin 의 影響 等을 廣範하게 觀察하고, 呼吸과 醱酵機能이 30,000r. 의 X-ray 照射에서 低下한다고 報告하였다.

한편 Remezova, 1959. 는 原子爐에서 放出되는 中性子, γ -ray 의 混合放射線의 影響을 酵母를 材料로 하여 研究하고, 呼吸과 醱酵作用은 致死線量에서도 如前히 進行되고, 그 抵抗順位를 增殖—呼吸—醱酵(大)順으로 되어 있음을 指摘하였다.

Caputo, 1960. 는 材料가 다른 動物의 癌細胞를 가지고 X-ray 의 影響을 研究하였는데 240Kr. 線量에서 好氣性 解糖作用은 140%로 增加하고, 反面 嫌氣性 解糖作用은 10%로 低下(抑制)한다고 하였다. 그러나 그 實驗에서 0.01M 의 glucose 를 基質로서 添加한 後 Warburg manometer 로서 測定하였기 때문에 그의 結果는 外呼吸과 內呼吸의 區別없이 考察되었던 것이다.

Ontko, 1964. 는 嚴格한 意味의 內呼吸作用을 動物癌細胞에서 實施하여 X-ray (1250r.)의 照射效果를 實驗한 結果 內呼吸이 200% 上昇함을 確認하고, 그 上昇의 機作을 細胞內의 基質濃度의 增加 또는 貯藏物質의 呼吸基質에로의 轉換結果라고 推定하였다.

Billen, 1953. 은 E. coli 에 對한 X-ray 의 影響研究에서 pyruvate 를 添加한 外呼吸이 低下抑制된다고 報告하였다.

以上과 같이 研究報文마다 呼吸과 醱酵能이 增加한다든가 또는 低下한다고 各各 相反되는 다른 結果를 報告하고 있는 것이다.

한편 Malinovskii, 1967. 는 最近 酵母의 放射線에 依한 障害作用이 glucose 를 培地에 供給함에 따라서 크게 回復된다고 하였다. 이것은 glucose 代謝와 放射線의 障害作用 사이에 어떤 關聯性이 있음을 示唆하는 興味있는 研究이다.

Billen, 1953., Caputo, 1960., O'Brien, 1960., Rothstein, 1960. 等은 한결같이 모두 放射線 主로 X-ray 에 依하여 生體膜이 變化하고 附隨的으로 透過性이 變한다고 指摘하고 있다. 即 Billen 은 A. T.P. 와 같은 高分子物質까지도 細胞外로 流出된다고 하였으며, Caputo 는 260m μ 波長 吸收物質의 流出을, O'Brien 은 K^+ ion 과 phosphate 의 流出을, Rothstein 은 amino 酸과 K^+ ion 의 流出을 各各 따로 報告하고 있다. 이와 같은 細胞原形質膜의 變化와 그에 따르는 透過性의 變動은 必然的으로 細胞의 外呼吸과 內呼吸에 差異를 나타내게 될 것이다. 그러나 많은 研究者들의 實驗結果가 正反對로 나타나는 것은 放射線에 依한 이 透過性의 動的 變化를 度外視하고, 皮相的 結果만을 가지고 報告하는 傾向이 있는 것으로 思料된다. 前報(金, 1967)에서 指摘한 바와 같이 放射線에 依한 細胞의 外呼吸의 低下와 內呼吸의 上昇 및 脫水素酵素能의 上昇, 同重量의 乾燥酵母에 있어서 蛋白質含量의 差가 生기는 現象 등의 原因이 모두 一連的으로 關聯性이 있는 것으로 思料되었다. 本 研究의 目的을 이와 같은 現象의 機作을 究明하는 데에 두고 酵母細胞內 炭水化物 含量을 呼吸, 醱酵를 通해서 直接的으로 分割定量을 實施하였다. Warburg 法으로서 는 問題의 核心을 解析하는데 不足함을 認定하였기 때문이다. 實驗過程에서는 EMP-pathway 와 TCA-cycle 의 enzymic pattern 및 그 activity 의 變化에 關心을 集中시키면서 細胞內 物質의 消長을 銳意檢討하였다. 炭水化物代謝에 對한 放射線의 影響은

膜透過性的 變化와 關聯시켜 가면서 考察하였다.

本 研究를 指導하여 주신 서울大學校教授 李敏載 博士, 研究遂行中 支援·激勵하여 주신 原子力研究 所長 李相洙博士와 生物學研究室長 李根培博士께 深甚한 感謝를 드립니다.

材料 및 方法

酵母의 同調培養 및 懸濁液調製

實驗材料는 *Saccharomyces cerevisiae* (第一物産洋行製, pressed baker's yeast)를 購入하여 使用하였다. Basket type centrifuge 로 4~5回 蒸溜水로서 洗滌한 菌體를 遠心分離하였다. 이때 anthrone 試藥으로서 上澄液의 糖反應이 나타나지 않을때까지 洗滌하였으며, 遠沈한 酵母菌體를 Ogur's medium (Table 1)에서 27~28°C, 2~3時間 shaker 로 振盪하여 細胞의 年齡과 크기를 synchronize 하였다. 이

菌細胞를 洗滌, 遠沈하여 適當量의 蒸溜水로서 suspension 을 만들고, 對照區와 照射區를 同一 濃度로 하여 分配하였다. 放射線 照射를 하기 前에 Warburg manometer 로서 菌體의 呼吸能을 check 하였다.

γ-ray 의 照射

γ-ray 의 照射는 本 原子力研究所에 備置되어 있는 panoramic gamma-irradiator, cobalt-60, 760 curie 를 使用하여 實施하였으며, 酵母의 懸濁液이 들어 있는 試驗管을 γ 線源에 密着시켜 240Kr.(1時間)의 線量을 照射하였다. 照射後 다시 遠沈하여 上澄液은 炭水化合物의 流出量 定量에 使用하고, 沈澱된 菌體는 wet weight 로서 100mg 씩 取하여 炭水化合物의 定量分析에 供하였다. 別途로 菌體의 乾燥量을 定量하기 위하여 wet weight 로서 100mg 씩 取하여 90°C 의 vaccum dry oven 에서 over night 하면서 乾燥시켰다.

Fig. 1. Fractionation scheme of carbohydrates in yeast cells.

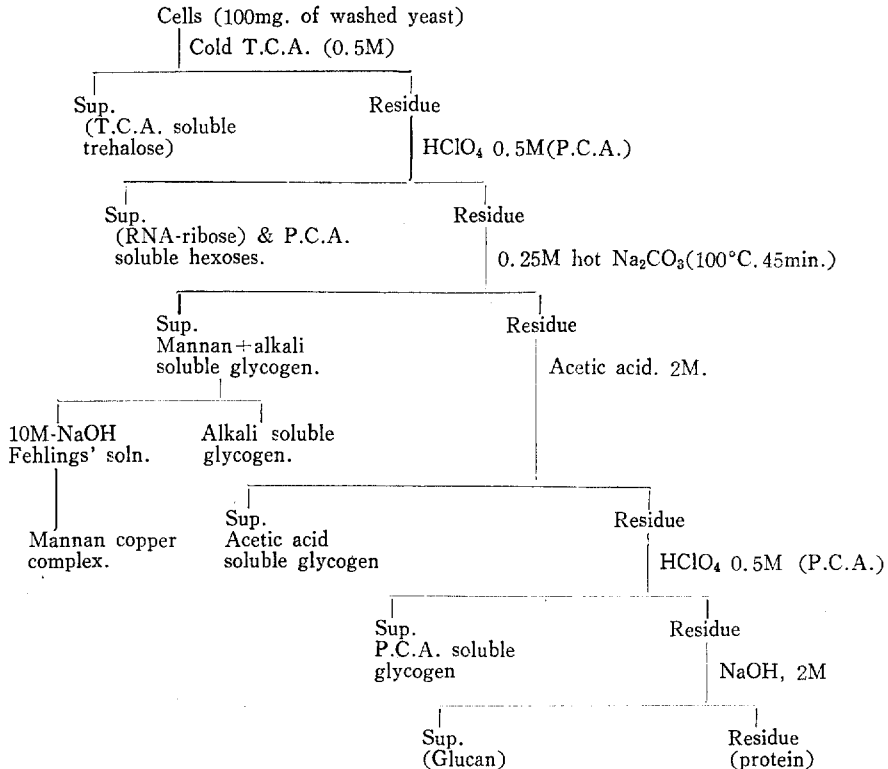


Table 1. Culture medium for synchronizing cells.

Yeast extract	0.2g
Potassium phosphate. monobasic	2.0g
Bacto peptone.....	3.5g
Dextrose.....	40.0mg
Ca-pantothenate	2.0mg
Thiamine	0.4mg
Inositol	10.0mg
Nicotinic acid	0.4mg
Pyridoxine	0.4mg
Para-amino benzoic acid	0.2mg
Riboflavin	0.4mg
Biotin.....	2.0μg
Dist. water	q.s.

Make up to 1 liter.

Culture time: One hour on shaker.

Temperature 27~28°C

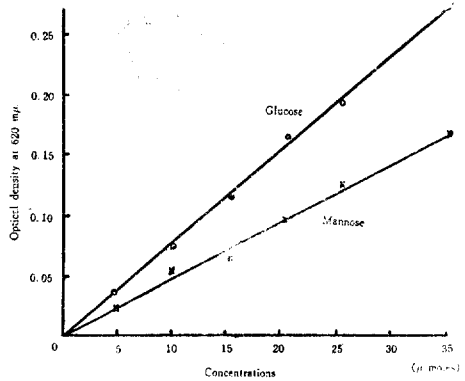
炭水化物の 分割定量方法

酵母細胞内の 炭水化物の 分割定量法은 Trevelyan, 1956.의 方法을 採擇하였으며 그 scheme 은 Fig. 1 과 같다.

100mg 의 洗滌, 遠沈된 菌體細胞를 0.5M 의 trichloro acetic acid 로서 抽出한 것을 anthrone 試藥으로서 發色시켜 單位重量當의 總炭水化物量을 calibration curve (Fig. 2)에 依하여 求하였다. 이 總炭水化物 分割內에는 hexose polymers, glycogen, glucan, mannan 과 trehalose 가 包含되는 것이다. anthrone reagent 에 依한 炭水化物の 發色 操作法은 嚴格하게 Trevelyan, 1956 年의 方法을 實施하였다.

冷 TCA(Trichloro acetic acid) 0.5M 로서 TCA-soluble trehalose 를 上澄液에서 얻고 그 沈澱物은 다시 PCA(Perchloric acid) 0.5M 로서 抽出하여 RNA-fraction 과 TCA-soluble hexose 의 mixed fraction 을 얻었다. 이 沈澱은 다시 0.25M 의 熱 sodium carbonate (100°C, 45分)로서 抽出하여 mannan 과 alkali soluble glycogen 의 두 混合 fraction 을 上澄液 部分에서 얻었다. 이 部分을 10M 의 sodium hydroxide 와 Fehling's soln.으로서 加水分解하여 mannan copper complex 를 만들고 mannose 로서 算出하였다. copper complex 以外의 部分은 alkali soluble glycogen 으로서 取扱하였다. 熱 sodium carbonate 抽出區에서의 沈澱物은 2M 의 acetic acid

로서 다시 抽出하여 acetic acid-soluble glycogen 의 上澄液을 얻고, 殘渣는 다시 0.5M 의 PCA 로서 抽出하여 PCA soluble glycogen 의 上澄液과 殘渣를 얻었다. 이 殘渣를 2M 의 sodium hydroxide 溶液으로서 抽出하여 glucan 의 fraction 과 protein 을 主로 含有하는 殘渣를 最終로 받았다.



- Remark: 1. The constant value of glucose per mannose is 1.65.
 2. Working solutions of glucose and mannose were prepared with saturated solution of benzoic acid.
 3. Trevelyan's method was introduced for color developing.

Fig. 2. Calibration curves of standard carbohydrates (glucose and mannose).

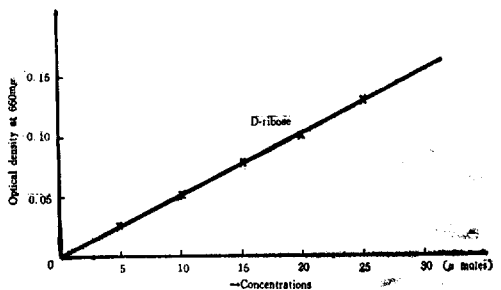


Fig. 3. Calibration curve of standard D-ribose.

RNA-fraction 의 定量法

PCA soluble RNA 의 fraction 은 그 속에 있는 ribose 를 hydrochloric acid-ornicol reagent 로서 發色시켜 Fig. 3 에 있는 calibration curve 에 맞추어

서 比色定量하고 RNA의 代謝도 아울러 관찰하였다.

Total carbohydrate의 算出法

Total carbohydrate를 算出하는 計算式은 다음과 같다.

$$\text{Total (as hexose)} = \text{Total (as glucose)} + \text{Mannan (as mannose)} - \text{Mannan (as glucose)}$$

※ Mannan (as glucose)는 glucose/mannose color ratio로 表示하였는데 그 數値는 1.65 이었다. (Fig. 2 參照)

好氣性呼吸과 嫌氣性醱酵의 實施

好氣性呼吸을 實施하는데 있어서는 蒸溜水內에 菌細胞를 懸濁시키고 shaker로서 2時間 振盪하였다. 이것은 好氣性內呼吸을 시킴으로써, 細胞內의 炭水化合物이 呼吸基質로서 어떻게 消耗되는가를 알기 위해서였다. 即 EMP-pathway와 TCA-cycle의 全過程을 통해서 炭水化合物의 變動狀況을 把握하고자 한 것이다.

嫌氣性醱酵은 nitrogen gas를 7.5kg./cm²/hr. rate로서 yeast의 suspensicon內로 供給하면서 細胞內의 炭水化合物을 嫌氣的으로 消耗시켰다. 外部로

부터 醱酵基質은 添加하지 않았다. 이것은 TCA-cycle의 活動을 5% 以下로 抑制하면서 EMP-pathway를 95% 以上 回轉하도록 한 것이다. (Chen, S.L. 1959.)

好氣性呼吸과 嫌氣性醱酵을 實施한 後 菌體를 遠沈하여 carbohydrate의 fractionation을 實施하였다.

實驗結果 및 考察

Bayker's pressed yeast (第一物產製)를 購入하여 同調培養시킨 後 Warburg manometer로서 呼吸能을 check한 結果는 Table 2와 같다. 이때 基質로서는 0.004% glucose溶液을 1ml 添加하였다. 表에서 보는 바와 같이 呼吸이 上昇한 것은 細胞內의 炭水化合物이 呼吸基質로서 利用되었음을 알 수 있다.

對照區(放射線非照射區)의 酵母細胞內에 들어 있는 總炭水化合物의 含量과 各分劃部分의 炭水化合物含量은 Table 3에서 보는 바와 같다. 이 表에서는 PCA-soluble hexose의 含量이 漏落되어 있다. 따라서 total carbohydrate가 340μg. 임에 對해서 fraction의 合計는 318μg. 이었다. 그 差가 PCA-soluble hexose에 該當하는 것으로 본다.

Table 2. Respiratory activity of yeast cells with Warburg's manometric methods.

Temp.: 28°C, QO₂: 0.75μl/mg dry wt./hr.

Flask const. (K)	Thermobarometer.		Endo-respiration				
			1.215				
Main compartment	None		Yeast suspension in Ogur's media* 1ml Distilled water 0.7ml				
Center well	None		KOH (10%) 0.3ml				
Side arm	None		None				
Time (minutes)	a	b	c	d	e	f	g
0	0.35		-1.6				
10	3.2	2.85	-3.6	-2.0	-4.85	5.89	5.89
20	3.0	-0.2	-8.2	-4.6	-4.4	5.35	11.24
30	3.0	0	-11.5	-3.3	-3.3	4.01	15.25

Remarks: * Shown in table 3.

** The Warburg manometer apparatus, Model V, B. Braun Melsungen.

*** g.....Value of total O₂ uptake

γ-ray, 240Kr.를 照射한 直後의 酵母菌細胞에 있어서, 總炭水化合物과 各分劃部分의 炭水化合物含量變化는 Table 4와 같다. 表에서 보는 바와 같이 放射線照射 直後임에도 不拘하고 被曝酵母細胞의 總炭

水化合物量은 30.6μg.이나 減少하였다. 이것은 放射線照射所要時間이 1時間인만큼 相當한 呼吸增加가 있었던 것으로 推測되며, 또 다른 한편으로는 炭水化合物이 細胞밖으로 流出된 것도 있을 것으로 生覺된

Table 3. Carbohydrate fractions of normal and synchronously cultured yeast cells.

Fractions of carbohydrates.	Estimation of contents	Mean (micro moles and micro grams of hexose or pentose/mg. of dried yeast.)	
		Micro-moles	Micro-grams
Total carbohydrate		157.6	340.4
Trehalose		58.4	126.1
RNA-ribose (pentose)		3.0	4.6
Mannan+Alkali soluble glycogen		33.1	71.5
Mannan (as glucose)		2.1	4.5
" (as mannose)		3.2	6.9
Acetic acid soluble glycogen		9.0	19.4
PCA soluble glycogen		17.7	36.2
Total glycogen		57.7	122.6
Glucan		28.9	62.4
Sum of fractions		148.2	318.0

Table 4. Carbohydrate fractions of yeast cells as gamma-irradiated.

Total retention time is 1 hour. 240Kr. doses are irradiated.
Mean μ .M. and μ .g. per mg. of dried cells.

Fractions of carbohydrates	Treatment.		Gamma-irradiated.		Leakage of carbohydrate. (A-B)	
	Control (A)					
	μ moles	μ .g	μ moles	μ .g	μ moles	μ .g.
Total carbohydrate	144.3	311.8	130.2	281.2	14.1	30.6
Trehalose	55.0	118.7	41.1	88.7	13.9	30.0
RNA-ribose	3.7	5.7	4.1	6.3	-0.4	-0.6
Mannan+Alkali soluble glycogen	28.7	62.0	28.1	60.6	0.6	1.4
Mannan (as mannose)	3.8	8.1	4.2	9.0	-0.4	-0.9
" (as glucose)	2.4	5.2	2.5	5.4	-1.1	-0.2
Acetic acid soluble glycogen	6.4	13.8	9.3	20.1	-2.9	-6.3
PCA soluble glycogen	14.4	31.2	13.2	28.6	1.2	2.6
Total glycogen	47.1	101.8	48.1	103.9	-1.0	-2.1
Glucan	23.8	51.4	21.5	46.5	2.3	4.9
Sum of fractions	129.7	280.0	114.9	248.1	14.8	31.9

Remarks 1. 100mg of centrifuged yeast cells were fractionated after irradiation.

2. Expression of total carbohydrate of yeast cell is as follows.

Total (as hexose)=total (as glucose)+mannan (as mannose)-mannan (as glucose).

다. 이 疑問은 Table 7 과 8 에서 解明이 되고 있다.

放射線被曝 酵母細胞를 2時間, 好氣性呼吸시킨 後의 總炭水化合物과 各分割炭水化合物의 量은 Table 5 및 Fig. 4 에서 보는 바와 같다. 總炭水化合物은 2.4% 減少한데 比해서 trehalose 는 47.6%로 많이 줄어들었다. 이 表에서 考察되는 것은 trehalose가 酵母細胞에 있어서 一次的 呼吸基質이 되고 있는 點이다. 이것은 放射線 照射에 依해서도 enzymic pattern 이 그대로 維持되고 있음을 意味한다. (Trevelyan, 1956., 1951., 1952.)

Trehalose가 減少하는 反面에 RNA-ribose 와 acetic acid-soluble glycogen, glucan 등은 若干씩 增加하고 있다. 이 原因은 好氣性呼吸이 energy 遊離過程인만큼, 體構成物質인 glucan 이 合成되었음을 意味하고 또 貯藏物質인 glycogen 으로 再合成되고 있음을 示唆한다. 따라서 放射線被曝으로 因하여 好氣性內呼吸이 增進하였음을 充分히 알 수 있다.

한편 mannan 은 alkali-soluble glycogen 과 함께 同一分割部에서 抽出되므로 copper complex 의 形

成이 實驗途中 如意치 못하였든 關係上 減少傾向을 보이코 있다. 그러나 實際로는 glucan 과 같이 細

胞壁物質로서 增加되었어야 할 物質인 것이다. 放射線被曝 酵母細胞를 2時間 嫌氣性醱酵을 시킨

Table. 5 Carbohydrate fractions of yeast cell which is gamma-irradiated and oxidized 2 hours under aerobic condition.

Mean μ .M. and μ .g. per mg. of dried yeast.
Total retention time is 3 hours.

Fraction of carbohydrates	Treatment		Gamma-irradiated of 240Kr. (B)		Percent of consumed carbohydrate. $\frac{B-A}{A}$ (%)
	Control (A)				
	μ moles	μ .g	μ moles	μ .g	
Total carbohydrate	120.4	261	117.5	253.7	-2.4%
Trehalose	31.4	68.4	16.6	36	-47.6%
RNA-ribose	4.2	6.4	4.8	7.4	14.3%
Mannan+Alkali soluble glycogen	37.9	81.8	37.7	81.5	-0.5%
Mannan (as mannose)	7.9	17.1	7.1	15.3	-10.1%
" (as glucose)	4.9	10.6	4.4	9.5	-10.1%
Acetic acid-soluble glycogen	5.4	11.7	7.4	16.0	37%
PCA soluble-glycogen	11.9	25.6	12.5	27.0	5%
Total glycogen	50.3	108.5	53.2	115.0	5.7%
Glucan	27.2	58.6	30.5	65.8	12.1%
Sum of fractions	117.1	252.7	107.4	232.2	-8.3%

Remark: 100mg. of centrifuged yeast cells were fractionated after two hours shaking, the yeast had been previously gamma-irradiated.

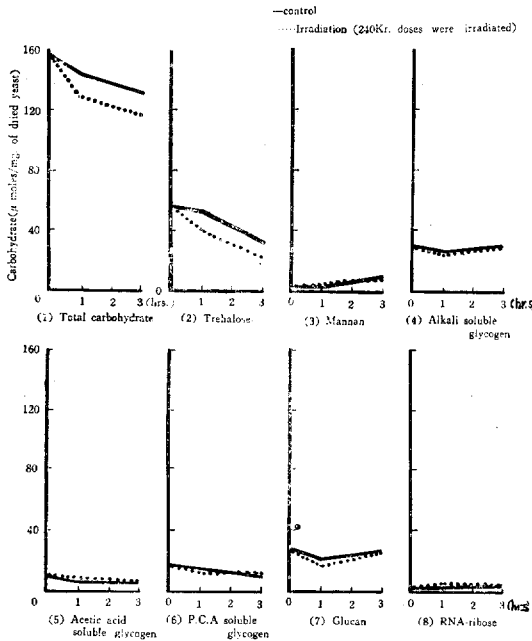


Fig. 4. Metabolic curves of yeast carbohydrate as gamma-irradiated and enforced to aerobic oxidation for 2 hours.

것의 總炭水化物量과 各分割部分의 炭水化物量은 Table 6 및 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 이 實驗에서는 total carbohydrate가 11%로 줄어들어서 好氣性呼吸때보다 約 8.7% 더 많이 減少하고 있다. 反面에 trehalose는 29.1%가 줄어들었는데 이것은 好氣性呼吸때보다 18.5%가 덜 減少하고 있다. 다시 말하면 嫌氣性醱酵에서는 合成에 必要한 energy의 遊離率이 낮기 때문에 total carbohydrate의 量이 好氣性呼吸때보다 적다. 이것은 EMP-pathway만을 回轉하는 嫌氣性醱酵과 TCA-cycle까지 回轉하는 好氣性呼吸의 pattern이 變치 않았음을 意味한다. 이 事實은 trehalose의 減少率을 보더라도 嫌氣性醱酵이 덜 減少하고 있는 것으로 보아 明白하다. RNA의 合成을 보면 好氣性側이 14.3% 合成된데 比하여 嫌氣性측은 2.5% 合成되고 있다. Total glycogen과 glucan은 거의 合成이 되지 않고 있다. 이와 같은 data로 보아서 放射線에 被曝된 酵母細胞는 (240Kr.의 線量은 蒸溜水懸濁液의 境遇 酵母細胞에 對하여 中程度의 障害를 주는 것으로 알려지고 있다.) EMP-pathway와 TCA-Cycle의 enzymic pattern이 健在하고 있음을 알 수 있고 그 enzyme activity는 相當히 增進되고 있는 것이다. 따라서 放射線照射에 依하여 呼吸과 醱酵이 抑制된

Table 6. Carbohydrate fractions of yeast cell which is gamma-irradiated and fermented 2 hours under anaerobic condition.

Total retention time is 3 hours.

Mean μ M and μ g. per mg. of dried yeast.

Fraction of carbohydrates.	Control (A)		Gamma-irradiated of 240Kr (B)		Percent of consumed carbohydrate. $\frac{B-A}{A}$ (%)
	Micromoles	Micrograms	Micromoles	Micrograms	
Total carbohydrate.	132.3	285.8	117.7	254.2	-11
Trehalose	33.3	72.0	23.7	51.0	-29.1
RNA-Ribose	4.0	6.1	4.1	6.3	2.5
Mannan + alkali soluble glycogen	34.6	74.7	33.7	72.8	-2.6
Mannan (as mannose)	8.6	18.7	8.4	18.2	-2.3
" (as glucose)	5.1	11.1	5.4	11.6	4.5
Acetic acid soluble glycogen	6.5	14.0	6.9	15.0	6.2
PCA-soluble glycogen	11.5	24.7	12.9	27.8	12.2
Total glycogen	47.5	102.3	48.1	104.0	1.3
Glucan	26.9	58.1	26.4	56.9	-1.9
Sum of fractions	116.3	251.0	106.5	230.1	-8.4

Remark: 1. 100mg. of centrifuged yeast cells were fractionated after 2 hours fermentation, the yeast had been previously gamma-irradiated.

2. Nitrogen gas was flowed into yeast suspensions at the rate of 7.5kg./cm² for 1 hour from gas bombe containing of 99.99% of purified nitrogen gas.

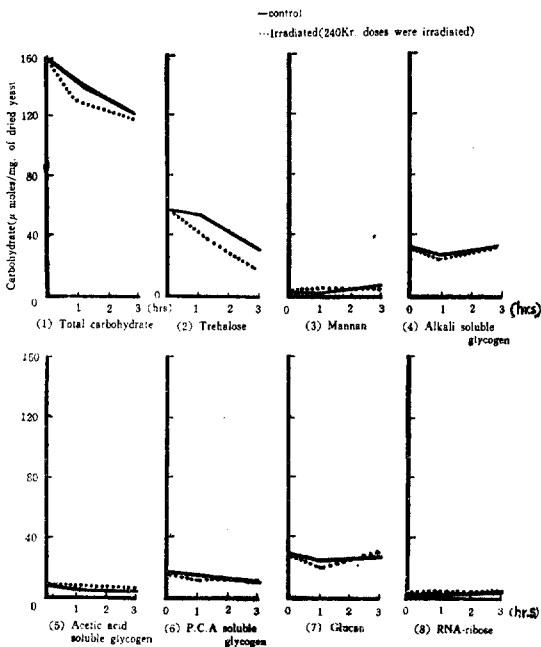


Fig. 5. Metabolic curves of yeast carbohydrate as gamma-irradiated and enforced to anaerobic fermentation for 2 hours.

다는 Billen (1953), Euler (1942) 등의 결론은 外呼吸의 境遇에만 合當하리라고 본다. 이 點에 對해서는 著者が 前報에서 區別하여 밝힌 바 있다. (金, 1967)

Ontuko, (1964)는 內呼吸機能이 動物의 癌細胞에서 X-ray 被曝으로 減弱하여 上昇한다고 하였으며, Bair (1954)도 100Kr.의 X-ray 照射에서 酵母의 CO₂ 生産이 低下하지 않는다는 것을 報告한 바 있는데 本 實驗結果는 이 兩者의 實驗結果와 一致한다.

放射線에 被曝된 酵母細胞를 90°C에서 vacuum dry 하는 過程에서 對照區細胞의 dry weight와 相當한 差異를 나타낼을 觀察할 수 있었다. 그 結果는 Table 7에서 보는 바와 같은데 放射線照射直後의 細胞는 19.1%만큼 dry weight가 줄어들었다. 이것은 放射線照射에 依하여 原形質膜의 透過性이 變化함으로써 細胞內의 物質이 細胞밖으로 流出되어 나가고 그 代身水分이 들어간 것으로 볼 수 있다. 即 乾燥하기 前에 sample을 各各 wet weight로서 100mg씩 秤量하였음에도 不拘하고 兩區細胞의 dry weight가 달라졌기 때문이다.

放射線照射로 因하여 細胞의 原形質膜이 變化하고 따라서 透過性에 異常이 생긴다는 것은 Billen (1953), Caputo (1960), O'Brien (1960) 및 Roths-

Table 7. Reduction of dry weight in irradiated yeast cells.

Treatment	Control			Gamma-irradiated (240Kr.)		
	Control	Aerobic oxidation.	Anaerobic fermentation	Immediately after irradiation	Aerobic oxidation.	Anaerobic fermentation.
Yeast cells						
Washed and centrifuged cells. (wet wt.)	(mg) 100	(mg) 100	(mg) 100	(mg) 100	(mg) 100	(mg) 100
Dry weight of cells.	(mg) 25.4	(mg) 23.1	(mg) 21.1	(mg) 20.8	(mg) 19.6	(mg) 17.0
Percentage (specific)	(%) 100	(%) 100	(%) 100	(%) 81.9	(%) 84.8	(%) 80.6

tein (1960) 등 많은 研究者들에 의하여指摘된 바 있다. 이 流出現象은 蒸溜水懸濁流內에 있어서는 線量增加에 正比例하고 있다. (金鍾協, 1968). 이와 같이 定量的으로 dry weight의 差異로서 透過性的 變化를 實驗한 다른 研究例은 아직 보지 못하였다.

한편 放射線被曝 細胞가 들어있는 懸濁液을 遠心 分離하여 얻은 上澄液에서 相當量의 많은 炭水化合物이 檢出되었다. 即 Dreywood의 anthrone reagent에 의하여 捕捉한 炭水化合物의 比較値는 Table 8에

서 보는 바와 같이, 放射線照射區에서 約 11倍 (1086%)에 達하는 炭水化合物이 流出되어 나왔다. Loofbourow (1948)는 紫外線照射를 받은 細胞에서 amino acid, nucleotide, phosphate ester 및 vitamin B group의 物質들이 流出된다는 것을 報告한 바 있고, X-ray에 의하여 potassium ion, phosphate, 高分子性 燐酸化合物 등이 流出하는 現象도 Rothstein (1960), Billen (1953), O'Brien (1960) 등에 의하여 報告되었지만은 炭水化合物의 流出이 對해

Table 8. Leakage of total carbohydrate from yeast cells as irradiated by gamma-ray.

Total retention time is 1 hours.

Mean (micromoles and micrograms/mg. of dried yeast cells)

Carbohydrate	Treatment	Control		Gamma-irradiated (240 Krs.)	
		Micromoles	Micrograms	Micromoles	Micrograms
Carbohydrate in supernatant of yeast suspension		0.147	0.317	1.594	3.443
Percentage of leakage		100%	100%	1086%	1086%

Remark : 1. Estimation of total carbohydrate content were carried with the method of Dreywood's anthrone reagent.

2. Analysis was initiated immediately after irradiation.

서는 實驗報告가 아직 없다. 本 實驗에서는 이 炭水化合物의 流出이 定量的으로 分析되고 또 이 炭水化合物이 呼吸 및 醱酵와 密接한 關聯性이 있다는 點에서 意義가 깊다. 現在까지 많은 學者들에 의한 呼吸代謝에 미치는 放射線의 影響研究報告가 區區하고 또 相反되는 結果가 報告되어 온 것은 膜構造의 變質 및 그 透過性的의 變化等 根本的의 前提條件을 無視하고 實驗을 하였기 때문이다. Bair(1954)는 phosphate와 pH의 差度가 放射線 感受性을 支配한다고 結論지었지마는 phosphate가 流出되고 있는 事實과 結付하여 論하지 못하였다. 또 O'Brien 같은 분은 1960년에 原形質膜에 對한 X-Ray의 影響이 active transport의 部分에 있지 않고 passive transport의 部分에 있다고 看破하였는데 本 實驗

에서 ion이 아닌 炭水化合物이 流出되는 것을 볼 때 O'Brien의 結論과 一致하는 것이다.

炭水化合物이 放射線被曝 細胞에서 流出되며 또 potassium과 phosphate가 流出되고 있는 致命的의 狀況 속에서 外部로부터 呼吸基質을 받아들이는 外呼吸過程이 抑制될 것은 당한 것으로 理解된다.

內呼吸樣式이 放射線照射에 의하여 增進되는 mechanism을 現在로서는 알 수 없지마는 다음 두 가지 點에서 考察할 必要가 있다. 即 細胞內의 炭水化合物이 流出되고 水分이 流入된 것으로 보아 細胞內部的 呼吸에 利用되는 炭水化合物의 濃度가 떨어지는 것이다. 따라서 正常細胞에 있어서 어느 程度 化學平衡을 이루고 있던 狀態로부터 酵素反應이 分解의 方向으로 進行될 moment가 發生한 것이라

고 볼 수 있다. 또 다른 面은 呼吸酵素와 結合되어 있던 比較的 安定된 complex compound가 excite되어서 酵素가 遊離되어 無統制狀態로 되는 mechanism도 생각할 수 있다. (J.C. Ballin, R.N. Feinstein 1952, J.S. Roth, 1956)

何如間 現在까지의 많은 放射線生物學에 關한 研究는 이 流出과 透過性의 變化를 實驗操作에서 考慮하지 않고 實施한 것이 많이 있다. 卽 phosphate, carbohydrate 및 amino 酸이 10~30% 流出하는데

도 不拘하고 表面上的 比較值 또는 對照值를 가지고 結果를 處理하여 온 弊端이 있다. 組織이나 細胞의 放射線被曝影響은 이 原形質膜의 透過性變化에 많이 支配되고 있음은 明白하다. 著者는 1967年에 放射線被曝酵母細胞의 蛋白質 含量의 分析에 있어서도 이 流出問題를 指摘한 바 있다. 一定量의 懸濁液속에 들어있는 packed cell number를 單位로 한 것과 dry weight를 單位로 하여 結果를 處理한 것에는 結論에 相當한 差異가 있게 되는 것이다.

摘 要

Saccharomyces cerevisiae (baker's pressed yeast)에 對하여 Co-60으로부터 放出되는 γ -線을 240Kr.線量 照射한 後, 그 細胞를 好氣性呼吸과 嫌氣性醱酵을 시키고, 細胞內의 總炭水化物量과 trehalose, RNA-ribose, PCA-soluble glycogen, alkali-soluble glycogen, acetic acid-soluble glycogen, mannan 및 glucan 등의 炭水化物 分割物의 消長을 定量的으로 分析하여 炭水化物代謝에 對한 γ -線의 影響을 直接的으로 究明하였다.

放射線被曝 酵母細胞의 透過性 變化에 따르는 炭水化物의 流出狀況 및 重量變化를 實驗하여 呼吸作用에 미치는 影響을 透過性和 聯關시키면서 考察하였다.

研究結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 韓國에서 製造되는 baker's yeast의 總炭水化物量과 trehalose, RNA-ribose, alkali-soluble glycogen, acetic acid-soluble glycogen, PCA-soluble glycogen, mannan 및 glucan의 各 含量을 定量하고 그 呼吸能을 測定하여 이 材料를 放射線被曝 實驗에 使用하였다.
2. 放射線被曝 直後의 酵母細胞에서 對照細胞보다도 約 11倍의 炭水化物이 流出되고 水分이 이에 代置하여 들어가는 것을 알았다.
3. 放射線被曝 酵母細胞를 가지고 好氣性呼吸을 시켜서 그 內呼吸이 增加하는 것과 貯藏物質, 細胞壁物質 및 RNA-ribose가 對照區에서 보다도 많이 合成되는 것을 알았다.
4. 放射線被曝 酵母細胞에 對하여 基質 添加없이 嫌氣性醱酵을 시킨 結果 對照區에서 보다도 더 많이 增進됨을 알았다. RNA-ribose, glycogen 등은 極少量씩 合成되었으며 體構成物質인 glucan 및 mannan의 合成은 對照區와 別差없었다.
5. 240Kr의 γ -線照射線量으로서는 EMP-pathway와 TCA-cycle의 pattern에는 變動이 없는 것 같았으며, 그 activity는 兩者 共히 相當히 增加하고 있고, 好氣性 呼吸區에서 더욱 많이 增加하였다.
6. 放射線被曝으로 因한 細胞內 炭水化物의 流出로 보아 細胞 原形質膜의 passive transport system에도 障害가 있음을 알았으며 外呼吸의 抑制要因이 內部物質을 外部로 流出시키는 透過性의 變動때문임을 알았다.
7. 放射線障害를 받은 細胞의 metabolic activity를 測定할 때, packed cell number나 cell volume 單位로써 比較할 것이 아니라 細胞의 dry weight에 對한 specific activity를 表示하여야만 正確하다는 것을 알았다.

References

1. Albaum, H.G., 1960. Serum enzymes following wholebody radiation in the rabbit, Radiation Research, vol. 12, p. 186-194.
2. Billen, D., et al., 1953. Postirradiation release of adenosine triphosphate from E. coli B/r., Archives of Biochem. and Biophysics. vol. 43, p. 1-10.
3. Billen, D., 1954. The effect of X-rays on the macromolecular organization of E. coli., J. of Bacteriology. vol. 67. No. 1. p. 191-197.

4. Billen, D., Stapleton, G.E. and Hollaender, A., 1953. The effect of X-irradiation on the respiration of *E. Coli*, *J. Bacteriology*, 65, p. 131-135.
5. Billen, D., 1957. Modification of the release of cellular constituents by irradiated *E. coli*, *Arch. of Biochem. and Biophysics*, vol. 67. p 333-340.
6. Bair, W.J., 1954. The effects of X-radiation on the metabolism of baker's yeast. Univ. of Rochester, Report, U.R. 321-1 of-7.
7. Cammarano, P., 1963. Protein synthesis, glycolysis, and oxygen uptake in hepatoma cells irradiated in vitro. *Radiation Research*. 18(1). 1-11.
8. Carney, G.C., 1965. Swelling and shrinkage properties of house fly sarcosomes after in vivo exposure to X-rays. *Radiation Research*, 25, 637-645.
9. Caputo, A and Giovanella. B., 1960. The action of ionizing radiations on the respiration, on the aerobic and anaerobic glycolysis on Ehrlich mouse ascites cells. *Radiation Research*, vol 13, p 809-813.
10. Conway, E.J., and Duggan, P.E., 1958. Use of K^{42} in the determination of the amount of K carrier in the yeast cell wall, *Peaceful Uses of Atomic Energy*. vol. 24, p 52. United Nations, Geneva.
11. Cook. A.H., 1958. Aspects of the chemical composition of yeast and synthesis and degradation of cellular carbohydrates by yeasts, *The chemistry and biology of yeasts*, Academic Press Inc. p 157-240. 369-428.
12. Daniel, L.M., 1958. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagents, *Science*. vol. 107, p 254-255.
13. Daniel, S. G., 1965. Biological effects of radiations, on cytosomal effects in cellular level, Blaisdell publ. Co. New York, p 33-50.
14. Demoss, J.A. and Swim. H.E., 1957. Quantitative aspects of the T.C.A. cycle in baker's yeast, *J. Bact.* vol. 74, No. 4. p 445.
15. Dreywood, R., 1946. Qualitative test for carbohydrate material, *Ind. & Eng. Chem.* vol. 18, p 499.
16. Dubois, M., et al. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. vol. 28, p 350.
17. Elbein, A.D., 1967. Carbohydrate metabolism in *Streptomyces*. *J. Bacteriology*, vol. 94, No 5. p 1520-1524.
18. Euler, H., et al. 1942. Einwirkung von Roentgenstrahlen auf Hefen und Hefenbestandteile. *Arkiv für Kemi, Mineralogi och Geologi*, Band 16A, No. 5. p 1-14. Upsala. Sweden.
19. Forshberg, A., and Klein, G., 1954. Studies on the effect of X-rays on the biochemistry and cellular composition of ascites tumors, *Exptl. Cell Res.* 7, 408-497.
20. Frampton, E.W., 1964. Synthesis of ribonucleic acid by X-irradiated bacteria, *J. Bact.*, vol. 87, No. 6, p 1369-1376.
21. Gal'tsova, R.D., and Vakina, I.P., 1962. Effect of X-ray irradiation upon the content of glycogen and reducing compounds in yeasts, *Mikrobiologiya*, 31:577-81.
22. Giese, A.C., et al., 1956. Effect of nutritional state and other conditions on ultra-violet resistance and photoreactivation in yeast. *J. of Bacteriology*, vol. 74, p 271-279.
23. Grosch, D.S., 1965. Biological effects of radiations, Blaisdell Publishing Co. N.Y.
24. Hagen, U., 1962. Radiosensitivity of the glycolytic enzymes in the nucleus, Second international congress of radiation research, Abstract Yorkshire, England. Silver and Documentary Publications, Ltd. London. p. 195
25. Hawrylewicz, E.J. et al., 1966. Effect of gamma and proten irradiation on lactic dehydrogenase isoenzymes. *Rad. Res.*, 28, 538-547.
26. Henneman, D.H., 1964. Influence of the physical state of the bacterial cell membrane upon the rate of respiration. *J. of Bacteriology*, vol. 87, No 6. p 1274-1280.
27. Hevesy, G.C., 1956. Biochemical irradiation effects on enzymes and other cellular constituents. p 25-72. *Advances in radiobiology, proceedings of fifth international conference of radiobiology*, Stockholm.
28. Hollaender, A. et al., 1954. Effects of radiation

- on bacteria. *Radiation Biology* 3 vols, 4 books, MacGraw-Hill Book. Co. Inc. N.Y.
29. Hutchinson, F., 1961. Sulfhydryl groups and the oxygen effect on irradiated dilute solutions of enzymes and nucleic acids. *Radiation Research*, vol. 14, 721-731.
 30. Keiner, A., 1953. Growth, respiration, and nucleic acid synthesis in ultraviolet-irradiated and in photoreactivated *Escherichia coli*. *J. Bact.*, vol. 65, No 1. p 89.
 31. Kotyk, A., and Kleinzeller, A., 1967. Affinity of the yeast membrane carrier for glucose and its role in the Pasteur effect, *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 106.
 32. Kim, J.H. 1967. Studies on the cellular metabolism in microorganisms as influenced by gamma-irradiation, on the respiration rate and dehydrogenase activity in yeast cells, *Korean Journal of Microbiology*, vol. 5, no 2. p 69-78.
 33. Kim, J.H. 1967. Studies on the changes of protein content and free amino acid pool in yeast cells irradiated by γ -ray. *Korean Journal Microbiol.* vol 5. No. 2, p 79.
 34. Klein, H.P., 1967. Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriology*, vol. 94, No 2, p 475-481.
 35. Koehler, L.H., 1952. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity, *Analytical Chemistry*, vol. 24, p 1576.
 36. Laser, H., 1962. Some observations on irradiation effects in yeast, *Rad. Res.*, 16, 471-482.
 37. Lewis, M. J., 1964. Release of nitrogenous substances by brewer's yeast, *Jour. Bact.*, vol. 87, No. 6, p1389-1396.
 38. Lewis, M.J. and Stephanopoulos, D., 1967. Glucose-induced release of amino acids from *Saccharomyces carlsbergensis* by action on the cytoplasmic membrane, *J. Bacteriology*, vol, 93, No 3, p 976-984.
 39. Malinovskii, O. V., et al., 1966. Intensity of post-irradiational regeneration of yeast cells on various media in the period preceding development of radiational damage to the multiplication process, *Nuclear Science, Abstract*, vol. 21, No. 15. #26700.
 40. Merrick, T.P., and Burce, A.K. 1965. Radiation response of potassium efflux in *Micrococcus radiodurans* and *Sarcina lutea*, *Radiation Research*, Vol 24, p 612-618.
 41. Mccary, W.L., et al. 1945. The colorimetric determination of pentoses and pentosans from plant material, *Arch. of Biochemistry*, vol 6, No 1, p 151.
 42. Morris, D.L., 1948. Quantitive determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagents, *Science*, vol 107, p 254-255.
 43. Northcote, D.H., 1952. The chemical composition and structure of the yeast cell wall, *The Biochemical Journal*, vol. 51, No. 2, p 222.
 44. O'Brien, R.T., 1960. Loss of cellular centituents from X-irradiated yeast, *Hanford Biology Research Annual Report for 1959*. H.W. -65000, p 154-158.
 45. O'Brien, R.T., 1961. Radiation effects on membrane permeability in yeast, *Hanford Biology Research Annual Report for 1960.*, p 87.
 46. Ogur, M., Minckler, S. and Lindegren, C.C., 1952. The nucleic acids in a polyploid period of *Saccharomyces*, *Arch. Biochem. and Biophysics*, vol 40, No 1, p 175.
 47. Ontko, J.A. and Moorehead. W.R., 1964. Increased endogenous respiration of ascites tumor cells after radiation exposure, *Radiation Research*. vol, 23, p 135-144.
 48. Pollard, E., 1954. The action of ionizing radiation on enzymes and viruses, *Biophysics Division, Yale Unveirsity, Radiobiology Symposium*.
 49. Pollard, E. and Vogler. C., 1961. Radiation action on some metabolic processes in *E. coli.*, *Radiation Research*, vol. 15, 109-119.
 50. Pollard, E., et al., 1966. Physical characteristics of the residual DNA in bacterial cells after degradation due to ionizing radiation, *Radiation Research* 28, 585-596.
 51. Rothstein, A. et al., 1946. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast, *J. Cell. Comp. Phys.*, 28, 231-252.

52. Rothstein, A., 1959. Biochemical and physiological changes in irradiated yeast, Effects of radiation on specific cellular constituents, *Radiation Research*, suppl., 1. 356-371.
53. Remezova, T.S., 1959. Effect of gamma-neutron radiation on microorganisms, *Radiobiology in English translation*, p 77-83. An SSSR.
54. Sparrow, A.H., ed. 1958, *Bibliography on the effects of ionizing radiations on plants (from 1896 to 1955)*, Brookhaven National Lab. & U.S. A.E.C.
55. Schoffeniels, E., 1966. A study of the effects of ionizing radiation and of their modification by chemical protectors on the permeability characteristics of living membranes, *Research Contract*, No. 162, I.A.E.A. Publications, No. 74, p 478.
56. Seifter, S.S. et al., 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent, *Arch. Biochem.* vol. 25, p 191-200.
57. Schachinger, L., and Hug, O., 1962. Radiation effects on metabolism and permeability of mitochondria, *Second International Congress of Radiation Research*, England. p. 196.
58. Spiegelman, S., and Nozawa, M., 1945. On the inability of intact yeast cells to ferment their carbohydrate reserves, *Arch. of Biochemistry*, vol. 6-7, p 303.
59. Spoerl, E. and Qtiner, C.W., 1961. Glucose uptake and dissimilation by X-irradiated, starved, and division-inhibited yeast, *J. Bacteriol.*, vol. 82, 764-9.
60. Spoerl, E., et al., 1964. Permeability changes in yeast cells after X-irradiation and starvation, *Radiation Research*, 21. 86-90.
61. Stuard, B.O. and Stannord, G.N., 1966. The radioprotection of *saccharomyces cerevisiae* by cystamine as measured by different criteria of cell damage, *Radiation Research*, 28, 609-623.
62. Trevelyan, W.E. et al., 1952. Synthesis of cell carbohydrates during giucose fermentation, and its inhibition by azide, *The Biochem., J.*, vol. 50, p 303.
63. Trevelyan, W.E. and Harrison, J.S., 1952. Fractionations and microdetermination of cell carbohydrates, *The Biochem., J*, vol. 50, p 289.
64. Trevelyan, W.E., and Harrison, J.S., 1956. Studies on yeast metabolism, the trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation, *The Biochemical J.*, vol. 62, p 177.
65. Trevelyan, W.E., and Harrison, J. S., 1956. Studies on yeast metabolism, yeast carbohydrate fractions, separation from nucleic acid analysis, and behaviour during anaerobic fermentation, *The Biochemical Journal*, vol. 63, No. 1.
66. Thomas, H.W., 1960. Comparative X-ray sensitivities of related respiring and fermenting yeast, *Rad. Res.*, 13, 335-342.
67. Wolstenholme, G.E.W. ed., 1956. *Ionizing radiations and cell metabolism*, Ciba Foundation Symposium, Little Brown and Co., Boston.
68. Yamazaki, K. and Oka et al. 1964. Microscopic observation of irradiated yeast cells. *Tokyo Metro. Isotope Res. Center, Annual Report.* vol. 3, p 129.