

클로렐라의 葉綠體 發生過程에 있어서의 核酸 및 蛋白質의
生合成에 관한 研究*

李 永 祿 · 李 鍾 三
(高麗大學校 理工大學 生物學科)

Studies on nucleic acid and protein biosyntheses of *Chlorella*
cells during the course of the chloroplast development

Yung-Nok LEE and Chong-Sam LEE

(Dept. of Biology, College of Science and Technology, Korea University)

ABSTRACT

Nucleic acid and protein biosyntheses of the glucose-bleached *Chlorella* cells in relation to the process of the chloroplast reformation were traced, by measuring the changes in the amounts of cell constituents and nuclease activities of the cells during the greening process.

The contents of RNA and protein of the glucose-bleached cells decreased significantly, while the contents of nucleotides and amino acids of the cells increased to compared with those of the control, showing that the biosynthetic activities of RNA and protein of the cells were inhibited severely in the glucose-bleaching process.

In the early greening process of the glucose-bleached *Chlorella* cells the contents of RNA and protein of the cells increased significantly without any increase in the chlorophyll contents showing that the massive biosyntheses of RNA and protein proceed prior to the chlorophyll biosynthesis in the cells.

The phosphate contents in the DNA fraction of the glucose-bleached cells decreased, but the contents of acid-insoluble polyphosphate increased to compared with those of the control in the early greening process, exhibiting that the incorporation of the phosphorus from acid-insoluble polyphosphate into DNA was retarded.

In the greening process of the glucose-bleached cells the ribonuclease and deoxyribonuclease activities of the cells decreased to compared with those of the control, although the initial activities of the both enzymes in the cells were far great compared with the control.

Although the initial phosphate contents in the lipid fraction of the glucose-bleached *Chlorella* cells were more great than the control, the phosphate contents in the lipid fraction of the cells decreased in the early greening process to compared with the control, and then increased in the late developmental stages in which massive chlorophyll biosynthesis occurred.

* 본 研究는 1969 年度 文敎部 研究補助費의 도움을 받았다.

緒 論

근래에 와서 葉綠體는 특이한 DNA(Kislev *et al.*, 1965; Tewari and Wildman, 1966)와 리보솜(Odintsova *et al.*, 1964; Stutz and Noll, 1967)을 가지며, DNA (Tewari and Wildman, 1967), RNA(Schweiger and Berger, 1964; Semal *et al.*, 1964) 및 단백질(Eisenstadt and Brawerman, 1963; Davies and Cocking, 1967) 등을 합성하여 반자율적으로 증식하는(Gibor and Granick, 1964; Park, 1965) 세포기관이라는 증거가 축적되고 있다. 엽록체 리보솜 및 엽록체 DNA의 존재는 엽록체의 형성능과 관련되어 있고 엽록체 DNA의 증식은 결국 엽록체의 증식을 유발하게 될 것으로 생각되나 엽록체의 발생과정이 세포의 다른 기관에 어느 정도로 의존되며 어떠한 순서로 진행되는가에 대해서는 아직도 명확하지가 않다.

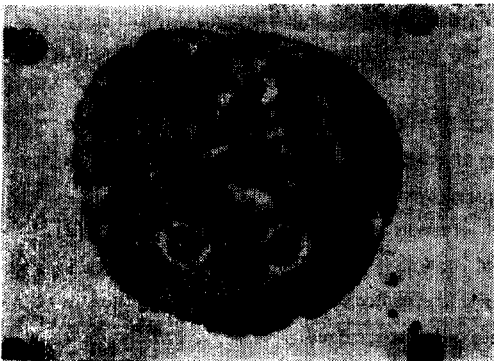
이 研究에서는 *Chlorella*의 정상적 엽록체 발생과정과 황백화한 세포의 綠化과정에 있어서의 DNA, RNA 및 단백질의 생합성능의 변화와 오르토탄산의 유기물로의 전환과정을 측정 비교하고 RNase 및 DNase의 활성의 변화를 추적하여 엽록체의 ribosomal RNA가 현저히 퇴화된 glucose-bleached cell (Mihara, Kimura and Hase, 1968)의 엽록체 발생 과정에 있어서의 物質代謝의 특성을 밝히고자 하였다.

材料 및 方法

*Chlorella ellipsoidea*를 기본배지(Lee, 1969)에 50 mM의 포도당을 첨가한 포도당 배지에서 광선하에 CO₂를 공급하면서 배양하면 세포는 C:N 비율의 불균형에서 오는 황백화현상을 유발하게 된다. 이러한 배양조건하에서 7일간 배양한 glucose-bleached cell은 엽록소 뿐만아니라 라메라의 구조도 정상세포에 비해 상당히 퇴화하였는데 Fig. 1에 전자현미경상을 정상적인 독립영양 조건하에서 자란 세포의 그것과 비교해 보기로 한다. 이 glucose-bleached cell을 기본 배지에 접종하여 독립영양 조건하에서 배양하고 접종시와 배양의 중간기에 일정량의 세포를 수확하여 그 綠化過程을 추적하고, 세포를 분획하여 여러가지 세포구성 성분의 함량의 변화와 酵素活性의 변화를 측정하였다.

綠化過程의 추적: Glucose-bleached cell을 독립영양 조건하에서 배양하였을 때 시간의 경과에 따른 세포의 녹화과정을 추적코저 접종시와 배양의 중간기에 일정량의 세포를 수확하여 packed cell volume과 660 m μ 및 540 m μ 에 있어서의 optical density를 각각 측정하였다. 이들로부터 산출한 DOD(OD₆₆₀—OD₅₄₀)/ml cell/liter medium의 변동에 의하여 세포의 綠化과정을 클로로필 함량의 변화를 척도로 하여 추적하였다.

細胞의 分割操作: 접종시와 배양의 중간기에 일정량의 세포를 수확하여 M/500 K₂SO₄ 용액으로 씻은 다음 여러가지 細胞구성 성분



Normal cell



Glucose-bleached cell

Fig. 1. Electron micrograph of normal and glucose-bleached *Chlorella* cells.

으로 분획하였다. 核酸의 分離는 Schmidt-Thannhauser 法(1945)에 의거하였고 폴리인산 및 RNA-polyphosphate의 분리는 Correll-Tolbert(1962)의 방법을 다소 개량하여 행하였다. 細胞를 먼저 5% 冷 PCA(perchloric acid)로 두번 抽出하고 酸不溶性 標品은 ethanol-ether(3:1)로 (3回) 60°C에서 계속 抽出하였다. 酸不溶性 非脂質 標品은 室溫에서 한시간 동안 KOH로 pH 11.5로 조정 한 증류수에 현탁하여 무기 polyphosphate와 RNA-polyphosphate 복합체를 용해시켜 두번 추출하였다. 합한 上澄液은 10% 氷초산으로 pH 4.5로 조정 한 다음 0°C에서 한시간 동안 방치한 후 소량의 沈澱物을 제거하였다. 上澄液을 dil. HCl로 pH 3.5로 조정 한 다음 2倍 용량의 ethanol을 가하여 침전 한 RNA-polyphosphate 복합체와 酸不溶性 폴리인산을 分離하였다.

酸不溶性 非脂質 非폴리인산 標品은 pH 4.5에서의 침전물과 함께 0.5 N의 KOH로 처리하여 37°C에서 16~18시간 동안 RNA를 가수분해시켜 침전물(다당류)을 제거하고 5% PCA로 中和한 후 동량의 PCA를 가하여 2.5% 용액이 되도록 하였다. 上澄液(RNA 分劃)을 제거한 다음에 침전된 DNA 단백질은 5% PCA로 90°C에서 15분간 가열하여 DNA를 가수분해한 후 단백질로부터 分離하였다.

分析: 여러가지 分劃區에 있어서의 磷酸含量은 磷酸化合物을 ortho-phosphate로 가수분해시킨 다음 ammonium molybdate로 처리하여 spectrophotometer로 測定하였다. RNA, DNA 및 RNA-polyphosphate 복합체의 함량은 인산함량 뿐만 아니라 260 μ 에서의 optical density로도 測定하여 그 값을 비교하였고, 뉴클레오티드는 PCA 可溶性分劃의 일정량을 취하여 charcoal(Norit SX 30)을 가하고 잘 흔들어서 0°C에서 30분간 吸着시킨 다음 원심분리로 charcoal을 분리하고 1N H₂SO₄를 가하여 100°C에 10분간 가열하여 유리된 표품의 자외부 흡수치를 측정하였다. 단

백질분획은 H₂SO₄로 가수분해한 다음 아미노酸의 양을 ninhydrin 反應 (Troll and Cannan, 1953)으로 측정하였다. Schmidt-Thannhauser의 방법으로 분리한 *Chlorella* 세포의 RNA 분획에는 상당한 양의 난백질이 용출되므로(Aoki and Hase, 1964) RNA 분획의 일부를 취하여 그 아미노산 함량을 ninhydrin 반응으로 정량하여 alkali-labile protein의 양을 측정하였다. 탄수화물의 함량은 anthrone 法(Scott and Meluin, 1953)으로 정량하였다.

酵素의 活性測定: 약 0.2 ml(PV)의 凍結한 *Chlorella* 세포에 1N HCl로 처리한 소량의 石英砂와 10 ml의 차가운 증류수를 가하여 homogenizer로 저온에서 세포를 충분히 파쇄하였다. 이를 약 10,000×g에서 원심분리하여 얻은 세포의 水溶性분획을 저온에 저장하여 효소원으로 사용하였다. Ribonuclease 活性의 측정은 Anfinsen *et al.*(1954)의 방법에 의거하였는데 phosphate-citrate buffer를 사용한 예비실험에서 *Chlorella*의 RNase 活性은 pH 6.0 및 8.0에서 각각 극대의 活性을 가진다는 것을 알 수가 있었다. 따라서 RNase 活性은 pH 8.0 및 6.0에서 각각 측정하였는데 반응계는 효소표품 0.5 ml와 RNA 용액(5 mg/ml) 0.5 ml 및 0.04 M의 phosphate-citrate buffer(pH 6.0 또는 8.0) 1 ml를 함유토록 하였다. 25°C에서 30분간 반응시킨 후 곧 차가운 증류수로 반응액을 희석하여 260 μ 에서 optical density를 측정하였다. 효소의 활성은 대조구에 대한 단백질의 단위질량당의 OD의 증가를 산출하여 Δ OD로 표시하였다. Deoxyribonuclease의 측정은 Sung and Laskowski (1962)의 방법에 따라 행하였는데 예비실험에서 측정 한 DNase의 최적 pH는 8.0 및 4.0이었다. 효소의 활성은 역시 Δ OD로 표시하였다.

實驗 結果

Glucose-bleached cell을 정상적인 독립영양 조건 하에서 배양하였을 때 일어난 세포의 綠化過程을 추적한 실험결과를 Table 1 및 Fig. 2에 표시한다. 일정한 농도의 세포 현

Table 1. Changes in the packed cell volume and the chlorophyll contents measured by DOD ($OD_{660} - OD_{540}$)/ml cell/l medium, during the greening process of glucose-bleached *Chlorella* cells.

Duration of culture (hrs.)	P.C.V. (ml/l)	Optical Density					
		OD_{660}/l	OD_{660}/ml cell	OD_{540}/l	OD_{540}/ml cell	DOD	
Control	0	0.704	0.074	0.105	0.057	0.081	0.024
	5	0.850	0.068	0.890	0.066	0.078	0.011
	10	1.180	0.075	0.063	0.069	0.058	0.015
	21	1.500	0.094	0.063	0.077	0.051	0.012
	31	2.400	0.130	0.054	0.098	0.041	0.013
	45	3.600	0.211	0.059	0.153	0.043	0.016
Greening	0	0.708	0.034	0.048	0.033	0.047	0.001
	5	0.709	0.038	0.054	0.037	0.052	0.002
	10	0.850	0.042	0.049	0.040	0.047	0.002
	21	1.180	0.064	0.054	0.061	0.052	0.002
	31	1.600	0.099	0.062	0.075	0.047	0.015
	45	2.500	0.217	0.087	0.153	0.061	0.026

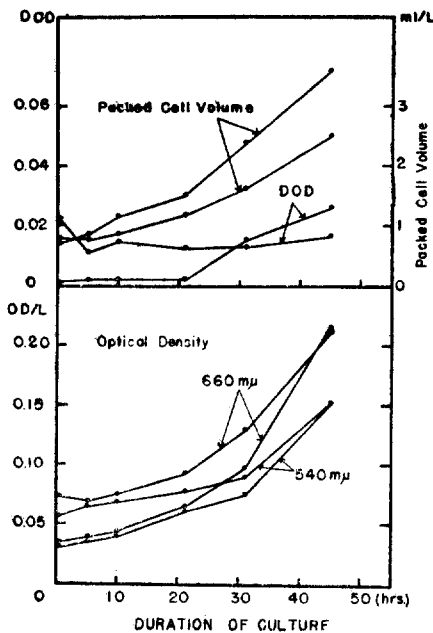


Fig. 2. Changes in the packed cell volume per liter medium and the chlorophyll contents measured by DOD of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process.

(○—○ control, ●—● greening)

탁액이 나타내는 $DOD(OD_{660} - OD_{540})$ 의 값은 세포의 엽록소함량을 나타내는 것으로 생각할 수 있는데 Fig. 2에서 보는 바와 같이

glucose-bleached cell은 접종후 21시간이 경과한 후에야 미토소 엽록소의 합성이 시작되었으나 31시간 후에는 엽록소의 생합성이 거의 완성되어 정상적인 세포로 성장하였다. 그러나 엽록소의 합성이 시작되기 이전인 접종후 21시간까지의 배양조기에 있어서도 RNA나 단백질과 같은 다른 세포구성 성분의 합성은 보다 광성하다는 것을 곧 알 수가 있었다.

Glucose-bleached cell의 化學的 成分組成과 黃白化한 이 細胞의 정상적인 독립 영양 조건하에서의 綠化과정에 있어서 일어난 세포의 核酸, 단백질, 탄수화물 및 인산화합물 등의 양적 변화를 각각 Table 2, 3, 4 및 Table 5에 표시하였다. 표에서 보는 바와 같이 glucose-bleached cell의 단위 용적당의 RNA 및 단백질 함량은 정상세포의 그것에 비해 현저히 감소하였으나 뉴클레오티드, 아미노산 및 磷脂質의 함량은 오히려 증가되어 있었다.

黃白化한 *Chlorella*의 綠化過程에서 일어난 細胞의 RNA, PCA-soluble nucleotide, DNA 및 RNA-polyphosphate 복합체의 자외부(260 mμ) 흡수치의 양적변화를 대조구의

Table 2. Amounts of UV-absorbing materials in each fraction of glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process.

Fraction	Duration of culture (hrs.)	Relative UV-absorbency at 260 m μ			
		Normal cells		Greening cells	
		$\mu\text{m}/\text{l}$ medium	$\mu\text{m}/\text{ml}$ cell	$\mu\text{m}/\text{l}$ medium	$\mu\text{m}/\text{ml}$ cell
DNA	0	0.209	0.297	0.156	0.220
	5	0.233	0.274	0.143	0.202
	10	0.299	0.253	0.178	0.209
	21	0.500	0.333	0.270	0.229
	31	0.528	0.220	0.472	0.295
	45	0.511	0.142	0.602	0.241
RNA-poly-phosphate complex	0	0.050	0.071	0.050	0.071
	5	0.028	0.033	0.023	0.032
	10	0.028	0.019	0.022	0.026
	21	0.077	0.042	0.073	0.062
	31	0.137	0.057	0.157	0.098
	45	0.135	0.038	0.277	0.111
RNA	0	0.613	0.871	0.437	0.618
	5	0.956	1.122	0.677	0.955
	10	0.825	0.610	0.401	0.472
	21	1.130	0.753	1.270	1.076
	31	1.674	0.698	1.998	1.248
	45	4.161	1.156	3.644	1.458
PCA-soluble nucleotide	0	0.034	0.048	0.038	0.052
	5	0.041	0.047	0.045	0.063
	10	0.041	0.035	0.043	0.051
	21	0.063	0.042	0.060	0.051
	31	0.121	0.050	0.139	0.087
	45	0.212	0.059	0.366	0.146

Table 3. Amounts of ninhydrin reactive substance in each fraction of glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process.

Fraction	Duration of culture (hrs.)	Amounts of ninhydrin reactive substances			
		Normal cells		Greening cells	
		$\mu\text{m}/\text{l}$ medium	$\mu\text{m}/\text{ml}$ cell	$\mu\text{m}/\text{l}$ medium	$\mu\text{m}/\text{ml}$ cell
PCA-soluble	0	7.87	11.18	9.90	13.97
	5	13.29	15.64	10.16	14.33
	10	19.80	16.78	18.63	21.92
	21	27.00	18.00	29.85	25.30
	31	49.30	20.54	48.00	30.00
	45	79.36	22.03	48.05	19.22
Alkali-labile protein	0	14.27	20.27	9.93	12.61
	5	11.78	13.86	7.69	10.85
	10	11.48	9.73	8.65	10.18
	21	22.00	14.67	20.50	17.37
	31	24.70	10.29	29.10	18.18
	45	40.18	11.16	43.04	17.22

	0	20.80	29.55	18.00	25.42
	5	36.30	42.71	17.50	24.68
Residual protein	10	37.95	32.19	21.78	25.62
	21	64.75	43.17	53.75	45.55
	31	185.00	77.07	129.00	80.62
	45	336.05	93.35	228.80	91.52
	0	35.07	49.79	27.93	39.45
	5	48.08	56.56	25.19	35.53
Total protein	10	49.43	41.89	30.46	35.84
	21	86.75	57.83	74.25	62.92
	31	209.70	87.38	158.10	98.80
	45	376.23	104.50	271.83	108.73

Table 4. Amount of carbohydrate (glucose equivalent) in each fraction of *Chlorella* cells during the greening process.

Fraction	Duration of culture (hrs.)	Amounts of anthrone reactive substances			
		Normal cells		Greening cells	
		$\mu\text{m}/\text{l}$ medium	$\mu\text{m}/\text{ml}$ cell	$\mu\text{m}/\text{l}$ medium	$\mu\text{m}/\text{ml}$ cell
PCA-soluble	0	3.12	4.43	1.17	1.65
	5	1.84	2.16	1.29	1.82
	10	2.48	2.10	1.72	2.02
	21	3.60	2.40	2.10	2.78
	31	5.10	2.13	2.60	1.63
	45	5.86	1.63	5.29	2.12
EtOH-ether	0	0.81	1.16	0.29	0.41
	5	0.60	0.70	0.96	1.35
	10	1.11	0.94	1.65	1.94
	21	1.22	0.81	0.70	0.59
	31	7.80	3.25	0.18	0.11
	45	11.87	3.29	1.93	0.77
Alkali-insoluble	0	9.10	12.93	7.14	10.11
	5	9.99	11.75	5.91	8.34
	10	12.97	10.90	8.35	9.82
	21	18.50	12.33	14.75	12.50
	31	33.40	13.92	35.00	22.87
	45	43.47	12.08	45.05	18.02
Total	0	13.03	18.51	8.60	12.15
	5	12.43	14.62	8.16	11.37
	10	16.56	14.12	11.72	13.79
	21	23.32	15.55	17.55	14.87
	31	46.40	19.33	37.78	23.61
	45	61.20	17.00	52.27	20.91

Table 5. Amounts of phosphate compounds in each fraction of glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process.

Fraction	Duration of culture (hrs.)	Amounts of phosphate			
		Normal cells		Greening cells	
		$\mu\text{m/l}$ medium	$\mu\text{m/ml}$ cell	$\mu\text{m/l}$ medium	$\mu\text{m/ml}$ cell
PCA-soluble	0	30.03	42.66	20.13	28.43
	5	41.90	49.29	29.00	40.90
	10	49.50	41.95	37.62	44.26
	21	63.75	42.50	54.40	48.02
	31	90.62	37.76	93.80	58.63
	45	112.68	31.30	131.27	52.51
EtOH-ether soluble	0	84.76	120.40	100.32	141.68
	5	108.90	128.12	103.95	148.03
	10	155.43	131.72	149.52	175.91
	21	173.90	115.93	77.00	65.25
	31	384.00	160.00	410.80	250.50
	45	464.75	129.09	478.19	191.28
Acid-insoluble poly-phosphate	0	107.90	153.27	105.60	149.15
	5	124.74	146.75	126.82	178.87
	10	76.23	64.60	160.37	188.67
	21	165.00	110.00	87.95	74.53
	31	237.50	97.71	296.40	185.31
	45	535.54	148.76	550.55	220.22
RNA-poly-phosphate complex	0	30.89	43.88	28.50	40.25
	5	23.43	27.56	18.15	25.61
	10	18.15	15.39	20.79	24.46
	21	39.40	26.27	35.50	30.08
	31	126.00	52.50	110.00	68.75
	45	293.15	81.43	251.68	100.67
Protein	0	14.30	20.31	14.19	20.04
	5	10.33	12.15	12.87	18.15
	10	12.87	10.91	15.61	18.38
	21	27.50	15.33	27.50	23.31
	31	42.50	17.71	47.30	29.56
	45	71.50	19.89	76.51	30.60
DNA	0	22.31	31.70	22.83	32.25
	5	24.39	28.69	22.28	31.42
	10	26.00	22.63	24.22	28.50
	21	35.10	23.40	33.75	28.60
	31	54.80	22.83	63.80	39.88
	45	83.23	25.90	91.23	44.49
RNA	0	22.75	32.32	21.84	30.85
	5	32.93	38.99	24.22	34.02
	10	33.00	28.81	29.79	35.05
	21	53.50	35.67	47.50	40.25
	31	96.30	40.10	97.00	60.62
	45	148.43	41.22	133.13	53.25

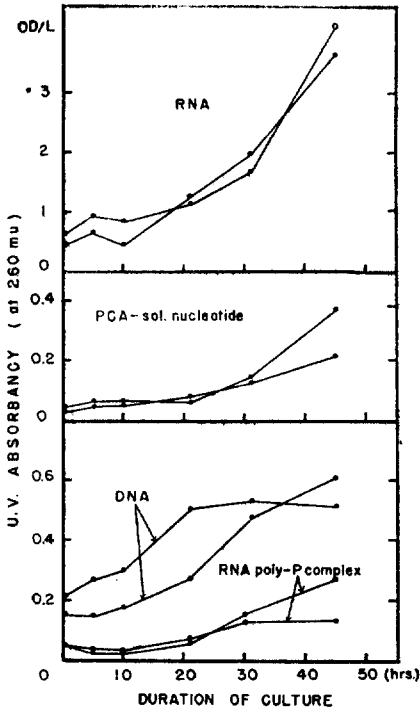


Fig. 3. Changes in the amounts of UV-absorbing materials in each fraction of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process.

(○—○ control, ●—● greening)

그것과 비교하여 Fig. 3에 표시한다. Glucose-bleached cell의 RNA 함량은 엽록소의 형성이 시작되기 이전인 배양초기부터 현저히 증가하여 완성한 엽록소의 형성이 일어났던 배양기간(21~31 시간)동안에 있어서는 오히려 대조구의 RNA 함량을 증가하고 있었다. 그러나 배양 초기에 있어서의 DNA 분획의 자외부 흡수물질의 양적증가는 대조구에 비해 상당히 완만하였다. 또한 glucose-bleached cell의 RNA 함량은 대조구보다도 감소된 반면 nucleotides의 함량은 오히려 증가되어 있어서 황백화한 세포에서는 RNA 합성능이 대조구에 비해 감소된 것으로 보여졌는데 이러한 경향은 세포의 엽록소합성이 시작되기 이전의 초기배양과정에서 완전히 소실되었다.

Fig. 4에는 glucose-bleached cell의 녹화 과정에 있어서의 아미노산 alkali-labile 및 alkali-stable protein 및 total protein의 함량의

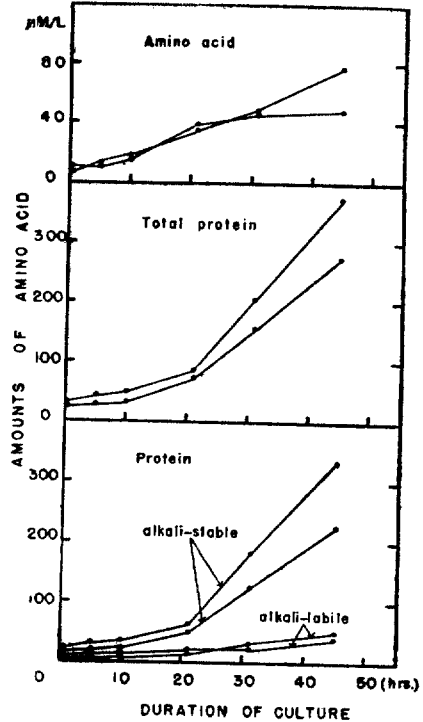


Fig. 4. Changes in the amounts of amino acid and protein of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process.

(○—○ control, ●—● greening)

변화를 표시하기로 한다. Glucose-bleached cell의 단백질 특히 알칼리에 안정된 단백질의 함량은 세포의 엽록소합성이 시작되기 이전인 초기 배양과정에서부터 증가하기 시작하여 엽록소의 형성기 및 그 후에 이르기까지 꾸준히 증가하였다. 그러나 아미노산의 함량은 glucose-bleached cell이 대조구에 비해 약간 많았는데도 불구하고 배양초기에 있어서의 아미노산 함량은 대조구보다도 약간 감소된 경향을 나타내었다.

황백화한 세포의 녹화과정을 통한 酸不溶性 폴리인산, DNA 및 RNA-polyphosphate, 단백질 등의 분획에 있어서의 인산 함량의 변화를 Fig. 5 및 Fig. 6에 각각 표시하고 지질분획에 있어서의 인산 함량의 변화와 탄수화물 함량의 양적변화를 Fig. 7에 표시하기로 한다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 黃白化한 세포

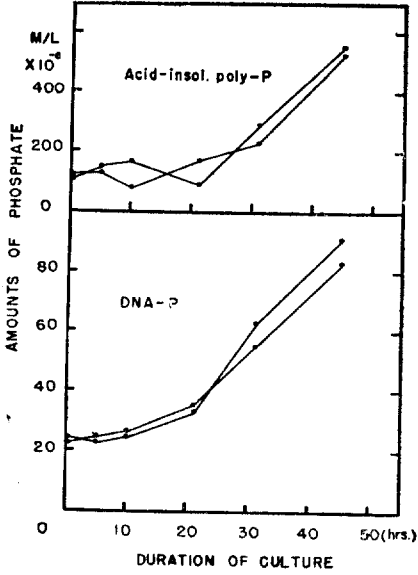


Fig. 5. Changes in the amounts of phosphate in the PCA-insoluble polyphosphate and DNA fractions of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process. (○—○ control, ●—● greening)

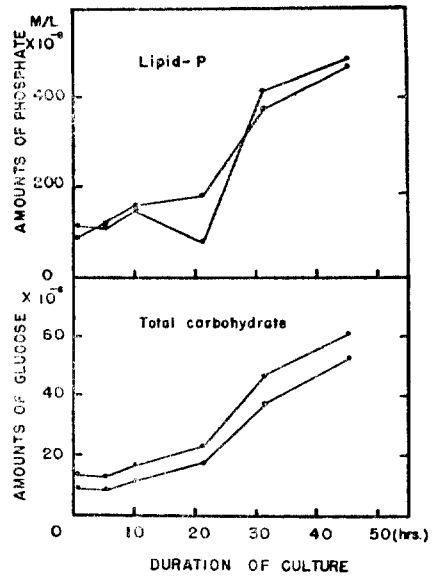


Fig. 7. Changes in the amounts of lipid-P and carbohydrates of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process. (○—○ control, ●—● greening)

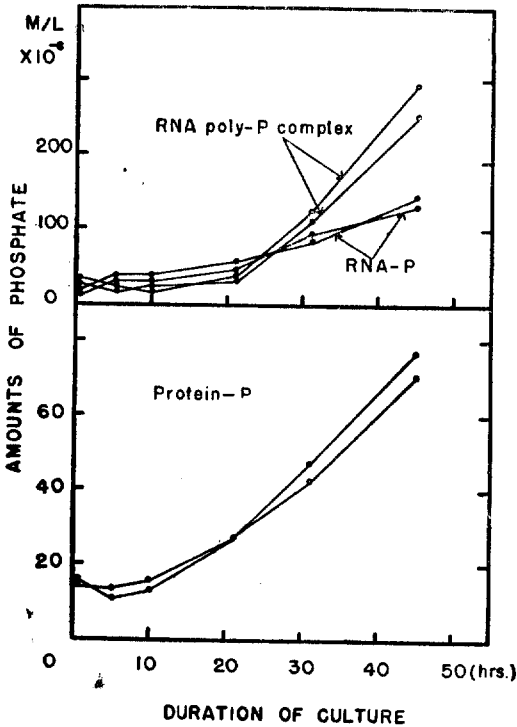


Fig. 6. Changes in the amounts of phosphate in the RNA, RNA-polyphosphate complex and protein fractions of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process. (○—○ control, ●—● greening)

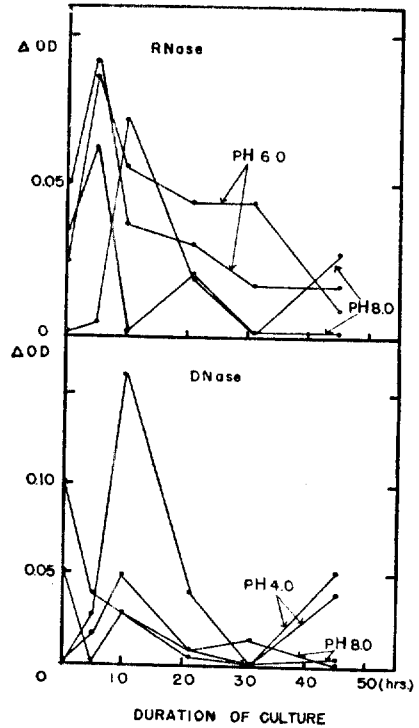


Fig. 8. Changes in the ribonuclease and deoxyribonuclease activities of the glucose-bleached *Chlorella* cells during the greening process. (○—○ control, ●—● greening)

의 酸 不溶性 폴리인산 함량은 엽록소의 형성이 시작되기 이전의 배양초기에 있어서는 대조구에 비해 상당히 증가하였으나 이 기간 중의 DNA 분획의 인산 함량은 대조구보다도 약간 감소하였다. 그러나 Fig. 6에서 보는 바와 같이 이 시기에 있어서의 황백화한 세포의 단백질 분획에 있어서의 인산 함량은 오히려 대조구를 약간 능가하여 있었고 RNA-polyphosphate 분획에 있어서도 대조구에 비해 뚜렷한 인산함량의 감소를 찾아 볼 수는 없었다. 또한 Fig. 3과 Fig. 6을 비교하여 보면 RNA-polyphosphate의 인산함량은 RNA 분획의 인산함량에 비교할 수 있을 정도로 많았으나 자외선 흡수물질의 함량은 PCA 가용성 뉴클레오티드의 함량에 비교할 수 있을 정도로 적다는 것을 알 수가 있었다. Glucose-bleached cell의 지질분획에 있어서의 인산함량은 콜로로필의 합성이 왕성한 시기에 현저히 증가하였다.

Fig. 8에서 보는것 처럼 glucose-bleached cell의 ribonuclease 活性은 정상세포에 비해 월등히 높았으나 녹화과정의 초기에 급속히 저하되어 완전한 녹화가 이루어질 때까지 대조구보다도 계속 낮은 값을 유지하였다. 또한 정상세포의 deoxyribonuclease 活性은 pH 8.0에서나 pH 4.0에서도 거의 인식할 수가 없었으나 배양초기에는 상당히 높은 값을 나타내었는데에 반해 glucose-bleached cell의 deoxyribonuclease 活性은 상당히 높았으나 녹화과정의 배양초기부터 급속히 저하되어 녹화의 전 과정을 통하여 대조구보다도 낮은 값을 유지하였다.

考 察

本 研究에서 다량의 탄소원과 광선하에서 자란 glucose-bleached cell은 엽록소가 소실될 뿐만 아니라 엽록체의 라메라 구조도 퇴화되고 정상적으로 자란 세포에 비해 RNA와 단백질의 함량이 감소되었음을 나타내었다. 뿐만 아니라 glucose-bleached cell의 ribonuclease의 活性은 정상적인 세포에 비해 월등히 높

았는데 이러한 사실은 glucose에 의한 엽록체 퇴화의 초기 단계에서 엽록체의 ribosomal RNA가 급속히 파괴된다고 하는 Mihara *et al.*(1968)의 견해와 잘 부합된다. 또한 glucose-bleached cell의 단위 용적 당의 RNA 및 단백질의 함량이나 산 가용성 인산화합물과 산 가용성 탄수화물의 함량 등은 정상세포의 그것에 비해 감소하였는데도 불구하고 뉴클레오티드, 아미노산 및 지질 분획의 인산 함량 등은 오히려 증가하였던 것으로 보아 glucose-bleached cell에서는 뉴클레오티드나 아미노산으로부터의 RNA 및 단백질의 합성은 정상세포에 비해 억제되고 있으나 탄수화물로부터의 지질의 합성은 정상세포에서보다도 더 활발하였던 것으로 짐작된다.

이러한 glucose-bleached cell을 정상적 독립 영양 조건하에서 배양하였을 때 일어나는 엽록체의 녹화과정에 있어서의 몇 가지 특이한 물질대사의 특성을 포착할 수가 있다. 본 연구에서 glucose-bleached cell의 엽록소 형성은 접종 후 21시간이 경과한 다음부터 시작되었으나 이 때에 이미 RNA 및 단백질의 함량은 접종시에 비해 각각 2.8배 및 2.6배로 증가 되어 있었다. 이러한 사실은 세포의 엽록소 합성은 이에 선행하여 RNA의 합성과 단백질의 생합성이 왕성히 일어난 후에야 일어난다는 것을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 정상세포에 비해 월등히 높은 ribonuclease 活性을 나타내었던 glucose-bleached cell의 ribonuclease 活性이 엽록체 발생과정의 초기단계(접종후 10시간)에서 부터 급격히 저하되어 완전한 엽록체의 발생에 이르기까지 계속 대조구보다도 낮은 값을 유지하였다는 것은 엽록체 발생의 초기단계에서부터 세포의 RNA 합성이 활발하여진다는 사실과 잘 부합된다.

한편 엽록체 발생의 초기단계에 있어서의 세포내 인산화합물의 동향을 살펴보면 세포의 酸 不溶性 폴리인산 함량은 대조구에 비해 상당히 증가하였으나 엽록소의 합성이 시작되기 전인 이 기간 중의 DNA 분획의 인산

합량이나 자외부 흡수물질의 양은 대조구에 비해 감소되었다. 그러나 이 기간 중의 세포의 단백질 분획의 인산합량은 대조구를 약간 증가하고 있었고 RNA-polyphosphate 분획에 있어서도 대조구에 비해 뚜렷한 인산합량의 감소를 찾아볼 수는 없었다. 따라서 이러한 사실은 *Chlorella* 세포내에서 酸不溶性 폴리인산으로부터 磷이 단백질(Nihei, 1957), DNA(Miyachi and Tamiya, 1961) 및 RNA-polyphosphate 복합체(Lee, 1967) 등으로 전환된다고 하는 사실로 미루어보아 glucose-bleached cell의 엽록체 발생의 초기단계에 있어서는 산 불용성 폴리인산으로부터 DNA 로의 인산의 전환이 억제되는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 엽록소의 왕성한 합성이 일어났던 접종 후 21~31 시간 동안의 배양과정에서는 보다 왕성한 DNA의 생합성이 이루어 졌었다.

Glucose-bleached cell의 지질분획에 있어서의 인산합량은 정상적으로 자란 세포에 비해 약간 증가하였으나 엽록체 발생의 초기단계에서는 대조구보다도 오히려 감소되었다.

摘 要

황백화한 *Chlorella*의 녹화과정에서 DNA, RNA 및 蛋白質의 생합성능의 변화와 ortho-phosphate의 유기물로의 전환과정을 대조구와 비교 측정하고, RNase 및 DNase의 活性的의 변화를 추적하여 엽록체 발생과정에서 물질대사의 특성을 논의하였다.

Glucose-bleached cell의 RNA 및 단백질 함량은 정상세포의 그것에 비해 현저히 감소되었으나 뉴클레오티드 및 아미노산의 함량은 오히려 증가하여 RNA 및 단백질의 합성능이 정상세포에 비해 저해되었음을 나타내었다.

황백화한 세포의 녹화과정에서 세포의 RNA 및 단백질 함량은 엽록소 합성이 시작되기 이전의 초기 배양과정에서부터 현저히 증가하여 엽록소 합성에 선행하여 RNA 및 단백질의 합성이 일어남을 보여 주었다.

녹화과정의 초기단계에서 DNA 분획의 인산합량은 대조구에 비해 약간 감소하였으나 산 불용성 폴리인산 함량은 상당히 증가하여 酸不溶性 폴리인산으로부터 DNA 로의 인의 전환이 억제됨을 나타내었다. 그러나 엽록소의 합성이 시작되면서부터 DNA의 합성은 현저하여졌다.

Glucose-bleached cell의 지질분획의 인산합량은 대조구보다도 많았으나 엽록체의 초기발생단계에서는 감소되었고, 그 후 엽록소의 합성기에는 현저히 증가하였다.

황백화한 세포의 RNase 및 DNase 活性은 정상세포에 비해 상당히 높았으나 녹화과정의 초기단계에서부터 급격히 저하되어 대조구보다도 낮은 값을 유지하였다.

그러나 엽록소의 합성이 왕성히 일어났던 접종 후 21~31 시간 동안의 배양과정에서는 세포의 지질분획에 있어서의 인산합량은 급격히 증가하여 대조구보다도 오히려 높은 값을 나타내었다. 따라서 엽록체 발생과정에서 지질은 엽록소의 합성이 왕성한 때 가장 많이 합성되는 것으로 생각할 수가 있다.

그러므로 glucose-bleached cell을 정상적 독립영양 조건하에서 배양하였을 때 일어나는 엽록체의 발생과정에서는 엽록소의 합성이 일어나기 전인 배양 초기에 먼저 RNA 및 단백질의 합성이 왕성히 일어나고 DNA의 합성은 다소 억제되나 그 후 RNA 및 단백질의 함량이 증가한 다음에 엽록소의 합성과 더불어 DNA 및 지질의 합성도 효율적으로 진행되어 정상적인 세포로 발육하여 증식하는 것으로 생각된다. 따라서 녹화과정에서는 퇴화된 엽록체가 엽록소를 합성하기에 앞서 퇴화된 엽록체 리보솜(Mihara *et al.*, 1968)의 조립을 위하여 nucleotide나 아미노산을 세포질에서 도입하여 RNA나 단백질을 합성하는 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Anfinsen, C.B., R.R. Redfield, W.L. Choate, J. Page, and W.R. Carroll, 1954. Studies on the gross structure, cross-linkage, and terminal sequence in ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, **207**, 201—210.
2. Aoki, S., and E. Hase, 1964. De- and Regeneration of chloroplast in the cells of *Chlorella protothecoides*. I. Synthesis of nucleic acids and protein in relation to the process of regeneration of chloroplast. *Plant & Cell Physiol.*, **5**, 473—484.
3. Correll, D.L., and N.E. Tobert, 1962. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. I. Isolation and physiology. *Plant Physiol.*, **37**, 627—636.
4. Davies, J.W., and E.C. Cocking, 1967. Protein synthesis in tomato-fruit locule tissue; incorporation of amino acids into protein by aseptic cell-free system. *Biochem. J.*, **104**, 23—33.
5. Eisenstadt, J.M., and G. Brawerman, 1963. The incorporation of amino acids into the protein of chloroplast and chloroplast ribosome of *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **76**, 319—321.
6. Gibor, A., and S. Gramick, 1964. Plastids and mitochondria; inheritable system. *Science*, **145**, 890—897.
7. Kislev, N., H. Swift, and L. Bogorad, 1955. Nucleic acid of chloroplast and mitochondria in Swiss chard. *J. Cell Biol.*, **25**, 327—344.
8. Lee, Y.N., 1967. Incorporation of phosphate into protein and other nitrogenous compounds in *Chlorella* cells. *Kor. J. Microbiol.*, **5**, 61—68.
9. Lee, Y.N., and C.S. Lee, 1969. Physiological studies on cell division by the technique of synchronous culture of *Chlorella*. I. On the changes in phosphorylation of the cells during the life cycle. *ibid.*, **7**, 1—9.
10. Mihara, S., K. Kimura, and E. Hase, 1968. Studies on ribonucleic acid from *Chlorella protothecoides* with special reference to the degradation of chloroplast RNA during the process of glucose-bleaching. *Plant & Cell Physiol.*, **9**, 87—102.
11. Miyachi, S., and H. Tamiya, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *ibid.*, **2**, 405—414.
12. 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**, 389—396.
13. Odinstova, M.S., E.V. Golubeva, and N.M. Sissakian, 1964. Chloroplast ribosomes. *Nature*, **204**, 1090—1091.
14. Park, R.B., 1965. In "Plant Biochemistry" (Bonner & Varner eds.), 124—150.
15. Schmidt, G., and S.J. Tannhauser, 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **161**, 93—99.
16. Schweiger, H.G., and S. Berger, 1964. DNA-dependent RNA synthesis in chloroplast of *Acetabularia*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **87**, 533—535.
17. Scott, T.A., and E.H. Melvin, 1953. *Anal. Chem.*, **25**, 1650. In "Methods in carbohydrate chemistry." Vol. I. (Whistler et al., eds.) 1962, Academic Press. p. 490.
18. Semal, J., D. Spencer, Y.T. Kim, and S.G. Wildman, 1964. Properties of a ribonucleic acid synthesizing system in cell-free extracts of tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Acta.*, **91**, 205—216.
19. Stutz, E., and H. Noll, 1967. Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in plants; evidence for three classes of ribosomal RNA in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **57**, 774—781.
20. Sung, S., and M. Laskowski, Sr., 1962. A nuclease from mung bean sprouts. *J. Biol. Chem.*, **237**, 506—511.
21. Tewari, K.K., and S.G. Wildman, 1966. Chloroplast DNA from tobacco leaves. *Science*, **153**, 1269—1271.
22. Tewari, K.K., and S.G. Wildman, 1967. DNA polymerase in isolated tobacco chloroplasts and nature of the polymerized product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **58**, 689—696.
23. Troll, W., and R.K. Cannan, 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **200**, 803—811.