

Chlorella의 生活史를 통한 -SH화합물 함량의 변화

崔 鎬 亨 · 李 永 祿

(高麗大學校 生物學科)

The Changes in the Amounts of SH Compounds in Chlorella during the Synchronous Culture

CHOI, HOHyung and Young Nok LEE

(Dept. of Biol., Korea University)

ABSTRACT

The content of sulfhydryl compounds in *Chlorella* cells during the life cycle in the synchronous culture is determined spectrophotomatically at 250nm(pH7.0) using *p*-CMB as SH-reagent.

The changes in the content of-SH compounds and protein in *Chlorella* cells is measured during the life cycle in connection with cell division and analyzed.

- 1) The amounts of total ninhydrin reactive substance increased with growth of cells but increased the more at the L₄ stage(cytokinesis stage) than at the L₂ stage(nuclear division stage).
- 2) The sulfhydryl content of *Chlorella* cells increased strikingly at the L₂ stage and decreased markedly at the L₄ stage.
- 3) The amounts of values-SH/protein showed a peak at the L₂ stage.

The increase of the amount of total-SH compounds of cells during the nuclear division period was considered to be caused by the weighty roles of protein-SH groups for the formation of nuclear division apparatus and for the enzyme activity.

서 론

-SH 라디칼은 생물학적으로 매우 중요한 역할을 하고 있어서 단백질의 구조 문제에 있어서나 효소의 활성 및 투과성, 또는 세포의 증식 등에서 이에 대한 연구가 각분야에서 활발히 이루어져 왔다. Klingenberg(1974)는 *p*-CMB를 투여하였을 때에 미토콘드리아의 인산투과성이 억제됨을 관찰하고 이는 미토콘드리아의 인산운반체의 -SH라디칼이 봉쇄되기 때문에 일어난 것이라고

하였다. 또한 Schoenbohn(1972)은 세포질에 있어서 염색체의 빛에 의한 이동현상도 -SH라디칼과 관련성이 있다고 하였다. Hase *et al.*(1958)은 S 결핍배지에서 자란 *Chlorella*의 정상배지에 있어서의 S의 흡수 과정을 특징하여 그 역할을 추적하였고, Shrift(1959)는 *Chlorella*의 세포분열과정에서 N와 S의 양적 변화를 추적하였으며 Levitt(1961)는 밀의 frost hardening 과정에서 -SH화합물 함량의 변화를 추적하고 SH화합물은 이 과정의 primary factor가 된다는 것을 밝힌 바 있다.

Sakai(1960)는 Sea urchin egg의 세포분열에서 -SH라디칼의 연관성을 보고하였으며 Degsson (1968)은 microtubule과 방추사의 형성과 분해에 관계하는 disulfide와 sulfhydryl cycle을 교란 시킴으로써 세포분열을 억제할 수가 있었음을 보고한 바 있다.

그러나 -SH라디칼의 이러한 역할에 대한 다양한 보고에도 불구하고 세포의 생활사를 통한 -SH 라디칼의 소장관계, 특히 藻類세포의 세포분열에 미치는 -SH라디칼의 역할에 대해서는 보고된 바가 거의 없었다.

*Chlorella*세포를 동조배양법으로 배양하고 세포의 생활사를 통한 단백질 및 -SH화합물함량의 변화를 추적하여 이를 세포분열과 연관시켜 해석한 결과 몇가지 所見을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1) 재료 : *Chlorella ellipsoidea*

2) 동조배양

*Chlorella ellipsoidea*를 무기배지(Lee 1969)에서 광도 7,500Lux, 온도 25°C를 유지시키며 약 5% CO₂를 포함하는 공기를 通氣하면서 배양하였다. 동조배양은 Da cell stage에서 시작하는 DLD'-method(Tamiya *et al.* 1961)로 하였다.

Da cell 群의 수집은 Morimura(1959)의 방법을 써서 혼합배양의 세포를 15~17시간 暗처리한 후 원심분리기를 써서 분리하였다.

3) 세포의 크기 및 성장률

세포의 크기 및 세포수는 Ocular micrometer 및 hemocytometer를 사용하여 측정하였고 성장률은 hematocrit를 써서 cell packed volume을 측정하였다.

4) 세포의 분획조작

동조배양동안의 여러 시기에 수확한 세포는 M/500 K₂SO₄로 3회 세척한 다음 Schmidt-Thannhauser 방법(1945)을 다소 개량하여 분획하였다.

세포는 먼저 5% cold PCA(perchloric acid)로 2회 추출한 다음 나머지를 ethanol: ether (3:1)로 60°C에서 3~4회에 걸쳐 계속해서 추출하였다.

나머지 물질은 0.5N KOH로 37°C에서 18시간 동안 처리하여 원심분리로 알칼리 가용성인 상등액과 알칼리 불용성인 分劃으로 분리하였다.

5) 분석

① 단백질의 정량

각 分劃의 단백질을 microkjeldal flask에서 5N H₂SO₄로 가수분해한 다음 Troll과 Cannan (1953)의 방법에 따라 아미노산의 量을 ninhydrin 반응으로 정량하였다.

② SH 정량

-SH라디칼의 함량은 Boyer(1954) 방법에 따라 p-CMB(p-Chloromercuribenzoic acid)로 반응시켜 형성된 mercaptan의 量을 glutathione의 -SH量을 기준으로하여 파장 250nm(pH 7.0)에서의 吸光度를 spectrophotometer로 측정하였다.

結 果

*Chlorella*의 동조배양에서 세포성장과정은 Fig. 1과 Fig. 2로 나타냈다.

이 실험에서 ripening기간은 L₁ cell에서 L₃ cell에 이르는 기간으로서 배양시간 18~25시간의 범위이며 이때에 핵분열이 일어났다. L₄ cell에서 Dn cell로 세포질분열이 일어나는 기간은 배양시간 25~35시간의 범위였다.

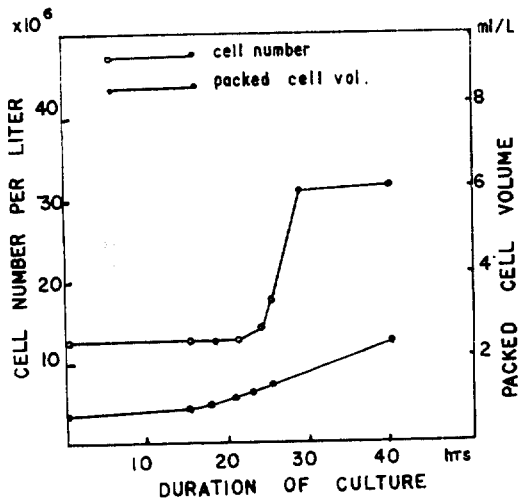


Fig. 1. Changes in the number of cells and the packed volume of cells per liter medium during the synchronous culture

Table 1. Amounts of SH groups and ninhydrin reactive substances in *Chlorella* cells

| Duration of culture(hrs) | Packed cell volume/L | Ninhydrin reactive substances | | SH content | | SH/protein (x10 ⁻³) |
|--------------------------|----------------------|-------------------------------|------------|-------------|------------|---------------------------------|
| | | μM/L medium | μM/ml cell | μM/L medium | μM/ml cell | |
| 0 | 0.75 | 377.75 | 503.67 | 0.465 | 0.620 | 1.23 |
| 15 | 0.90 | 430.13 | 477.92 | 0.461 | 0.510 | 1.47 |
| 18 | 1.05 | 522.25 | 497.38 | 0.790 | 0.751 | 1.51 |
| 21 | 1.20 | 731.63 | 609.67 | 1.567 | 1.305 | 2.14 |
| 23 | 1.35 | 696.80 | 516.15 | 1.664 | 1.232 | 2.39 |
| 25 | 1.60 | 745.70 | 466.06 | 0.991 | 0.619 | 1.33 |
| 27 | 2.20 | 969.63 | 440.74 | 1.055 | 0.480 | 1.09 |
| 35 | 2.50 | 1214.25 | 485.70 | 1.107 | 0.443 | 0.91 |

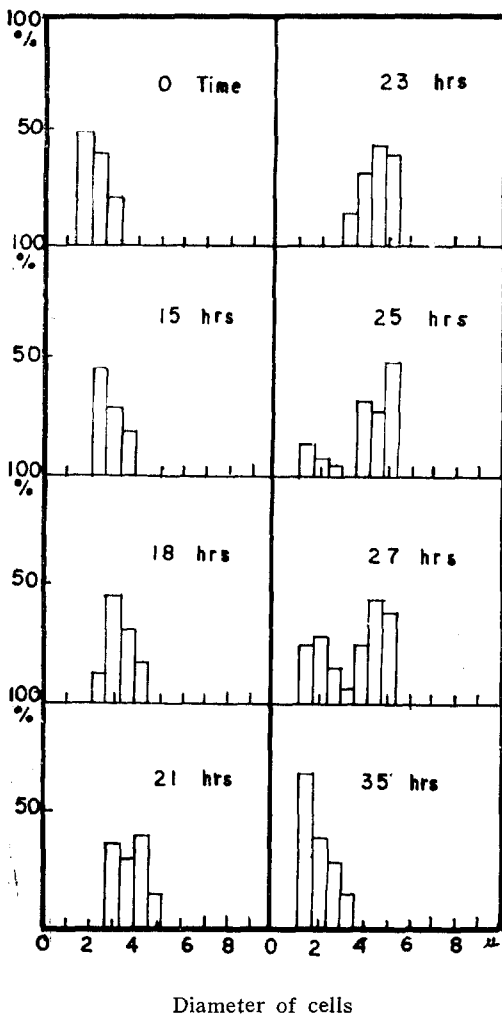


Fig. 2. Changes of the statistical distribution of cell size observed during the synchronous culture

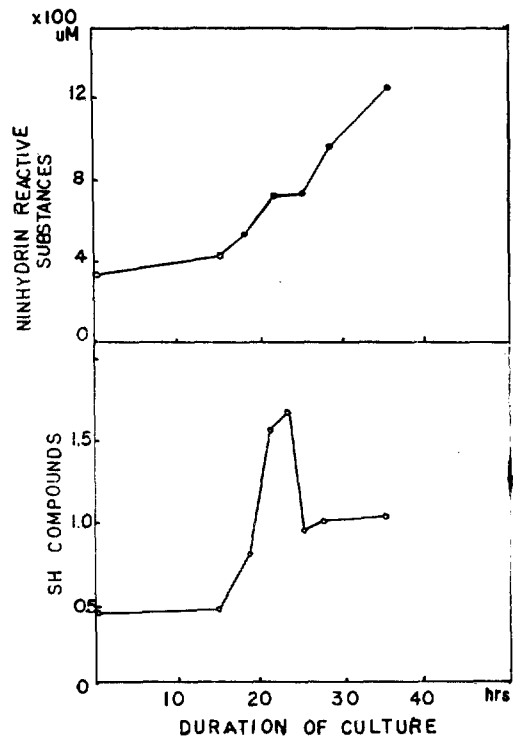


Fig. 3. Changes in the amounts of ninhydrin reactive substances and SH compounds in *Chlorella* per liter medium during the synchronous culture

동조배양중 각 stage에서 수확한 세포의 단백질 함량과 -SH라디칼 함량의 변화는 Table 1로 표시하였다.

Table 1에서 보여준 liter medium당 단백질 함량과 SH화합물의 함량변화는 Fig. 3으로 보여

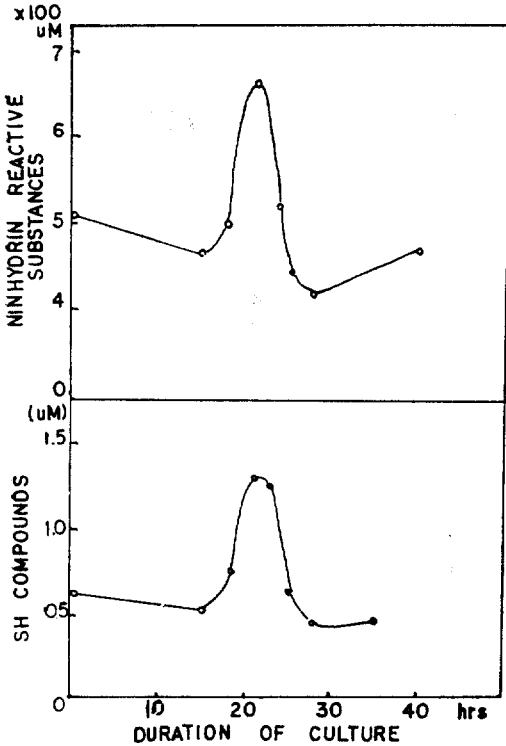


Fig. 4. Changes in the amounts of ninhydrin reactive substances and SH compounds per milliliter cell in *Chlorella* during the synchronous culture

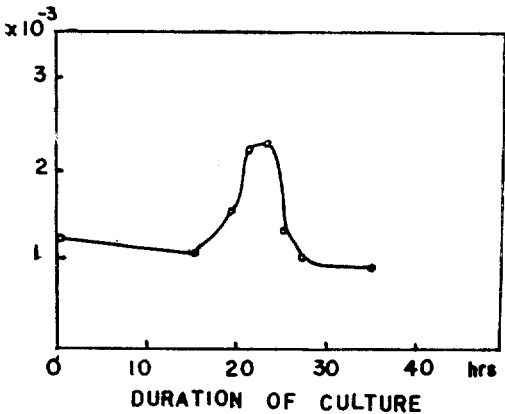


Fig. 5. Changes in the value of SH/protein in *Chlorella* during the synchronous culture

주었으며 ml cell 당 단백질합량과 -SH합량 변화는 Fig. 4와 같다.

또한 SH/protein의 값은 Fig. 5로 나타났다. 배양기간중 단백질합량의 변화는 세포 성장기간

동안 계속해서 상승했고 특히 배양 15시간 이후 21시간(핵분열전)까지 크게 증가했으나 핵분열 기간은 별로 증가를 보이지 않다가 배양 25시간(세포질분열기간) 이후에서 최대의 증가를 보였다. ml cell 당 단백질합량을 비교할 때에는 배양 시간 21~23시간에서 가장 높은 값을 나타냈다.

-SH라디칼 함량의 변화는 배양 18시간 이후부터 급상승하였고 20~23시간에서 최고값을 보였다. 배양 25시간에서는 그 값이 현저하게 떨어졌으나 27시간 이후부터는 다시 평형상태가 유지되었다.

ml cell 당 -SH라디칼의 함량은 쏘배양기간중 배양 21~23시간에서단 다른 기간보다 2배 정도나 높았고 나머지 기간은 거의 비슷한 함량을 나타내었다.

고 찰

본 실험중 배양기간 21~23시간에서 단백질합량의 증가에 비해 많은 -SH라디칼의 함량이 증가된 것은 이 기간이 핵분열기간으로서 핵분열에 요구되는 모든 대사에 관계하는 효소활성과 핵분열機構를 형성하는데 단백질분자內的 -SH라디칼이 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 보여진다.

핵분열기간에서 -SH라디칼의 함량이 증가한다는 사실은 동물세포를 사용한 Mazia(1961)나 Sakai(1960)의 sea urchin 실험에서도 보고된 바 있다.

한편 배양 25시간에서 증가된 단백질합량에 비해서 -SH라디칼 함량의 현저한 감소현상은 이 기간이 세포질분열기간으로서 핵분열機構가 해체되는 시기(Hiramoto 1956)라는 사실과 부합되며 또한 세포분열중 에너지대사에 대한 Zeuthen(1949)과 Scholander(1958)의 보고에서 핵분열기간은 정상적인 산소호흡으로부터 얻어질 수 있는 에너지의 3배를 요구했으나 세포질분열기에서는 다만 몇 % 정도만을 더 요구했을 뿐이라고 한 사실과도 연관되어지는 것으로 세포질분열기간은 핵분열기간에 비해 대사활동의 요구가 적으므로 이에 관련된 효소 활성에 필요한 -SH라디칼량의 감소 때문이라고 생각된다.

적 요

동조배양중의 *Chlorella*세포의 -SH라디칼 함량을 p-CMB를 사용하여 파장 250nm(pH 7.0)에서 spectrophotometer로 측정하였다.

*Chlorella*세포의 life cycle동안 단백질량과 -SH라디칼량의 변화를 세포분열과 연관시켜 측정 분석하였다.

1) 총 ninhydrin reactive substance는 세포성장과 함께 증가했으나 핵분열기(L₂ stage)보다는 세포질 분열기(L₄ stage)에서 크게 증가하였다.

2) -SH라디칼량은 L₂ stage에서 가장 높았고 L₄ stage에서 현저하게 감소하였다.

3) SH/protein에 대한 값은 L₂ stage에서 가장 높았다.

핵분열기간중 SH라디칼의 함량이 크게 증가한 사실은 핵분열機構 및 이와관련된 효소활성에 -SH라디칼이 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 생각되었다.

REFERENCES

- Alexander, P., 1960. Radiation-imitating chemicals. *Sci. Amer.* **202**, 99-108
- Benesch, R.E., Lardy, H.A., and Benesch, R., 1955. The sulfhydryl groups of crystalline proteins. 1. Some albumine, Enzyme, and Hemoglobins. *J. Biol. Chem.* **216**, 663-676
- Besch, R., and Benesch, R.E., 1961. *J. Biol. Chem.* **236(2)**, 405-410
- Boyer, P.D., 1954. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4331-4337
- Brown, D., Martinez, M., and Oleott, H.S., 1961. Sulfhydryl groups of Tuna myoglobins and hemoglobins, whale hemoglobin, tobacco mosaic virus, and ovalbumin. *J. Biol. Chem.* **236(1)** 92-95
- Deysson, G., 1968. Antimitotic substances. *Int. Rev. Cytol.* **35**, 99-158
- Eiji Hase, Hama Otsuka, Sayoko Mihara and Hiroshi Tamiya., 1958. Role of sulfur in the cell division of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Plant & Cell physiol.* 131-132
- Hermann Rink., 1975. Radiation damage to membrane bound sulfhydryl groups and permeability of yeast cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **27(3)**, 305-310
- Hiramoto, Y., 1956. Cell division without mitotic apparatus in sea urchin eggs. *Exp. cell Res.* **11**, 630-656
- Hiramoto, Y., 1965. Further studies on cell division without mitotic apparatus in sea urchin eggs. *J. cell Biol.* **25**, 161-167
- Klingenberg, Martin. Roger Durand and Bernard Guerin 1974. Analysis of the reactivity of SH-reagents with the mitochondrial phosphate carrier. *Eur. J. Biochem.* **42(1)**, 135-150
- Kambert, A., and Bajer, A.S., 1972. Dynamics of spindle fibers and microtubules during anaphase and phragmoplast formation. *Chromosoma.* **39**, 101-144
- Lee and Lee 1970. Physiological studies on cell division by the technique synchronous culture of chlorella(1)-On the change in phosphorylation of the cells during the life cycle. *Kor. J. Microbiol.* **8**, 1-12
- Levitt, J., Charles Y. Sullivan., Nils-Olof Johansson, & Robert M. Pertit., 1961. Changes in SH content during frost hardening. *Plant physical.* **36**, 611-616
- Mazia, D., 1961. How cells divide. *Scien. Amer.* (Sept) **205**, 100-120
- Mitchison, J.M., 1969. Enzyme synthesis in synchronous culture. *Science* **165**, 657-663.
- Morimura, Y., 1959. Synchronous culture of *Chlorella* II. Changes in content of various vitamins during the course of the algal life cycle. *Ibid*, **1**, 63-69
- Sakai, H., 1960. Studies on sulfhydryl groups. during cell division of sea urchin egg. -SH

- groups of KCl-soluble proteins and their change during cleavage. *J. Biophys. Biochem. cytol.* **8**, 609—615
19. Schmidt, G., and Thannhauser, S.J., 1945. A method for the determination of deoxyribo nucleic acid. Ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* **161**, 83—89
20. Schoenbohn, Ekkehard, 1972. The effect of SH-blockers and of light and dark on anchoring of *Mongeaia*-chloroplast in cytoplasmic parietal coating. *Z. flanzophysical* **66(2)**, 113—122
21. Scholander, P.F., Leivestad, H., and Soundnes, G., 1958. Cycling in the oxygen consumption of cleaving eggs. *Exp. Cell Res.* **15**, 501—511
22. Shwft. Alex., 1959. Nitrogen and sulfur changes associated with growth uncoupled from cell division in *Chlorella vulgaris*. *Plant physiol.* **34**, 405. 505—512
23. Tamiya H., Y. Morimura., M. Yokota., and R. Kjenieda., 1961. Mode of nuclear division in synchronous culture of *chlorella*: Comparison of various methods of synchronization. *Plant and physical* **2**, 383—403
24. Troll, W., and R.K. Cannan., 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acid. *J. Biol. Chem.* **200**, 803—811
25. Zeuthen, E., 1949. Oxygen consumption during mitosis: experiments on fertilized eggs of marine animals. *Am. Nat.* **83**, 303—322