

## *Chlorella* 세포에서 분리한 엽록체의 핵산합성에 미치는 Rifampicin의 영향\*

이종삼 · 정희숙

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

### Effect of Rifampicin on the Biosynthesis of Nucleic Acid in Chloroplast isolated from *Chlorella ellipsoidea*

Lee, Chong-Sam and Hee-Suk Jeong

Department of Biology, College of Natural Science, Sung Shin Women's University, Seoul, Korea

**Abstract:** *Chlorella ellipsoidea* were cultured in the media containing rifampicin for 7 days. Aliquot cells were taken out after the inoculation and at intervals during cultivation and growth rate of *Chlorella* cells was measured. In order to investigate the effect of rifampicin on the nucleic acid synthesis, nucleic acid and RNA polymerase were extracted from chloroplast isolated from these cells, and the contents of nucleic acid and activity of enzyme were measured to compared with those of the control. The inhibitory concentration of rifampicin on growth was 80 ppm. The DNA contents in chloroplasts isolated were decreased 60% to compared with control, whole cells were markedly decreased 70% by rifampicin. The contents of base in the RNA were decreased 46% by rifampicin in whole cell, and 77% of base contents were decreased in chloroplast. Rifampicin also inhibited the activity of RNA polymerase, therefore whole cell was decreased 10% of activity and chloroplasts were decreased 42% of activity.

**Key words:** *Chlorella ellipsoidea*, RNA polymerase, chloroplasts.

원핵세포에서나 진핵세포에서 여러가지 항생물 질들은 핵산이 합성되는 동안 각기 상이한 부위에서 현저한 저해작용을 한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. Pienokos(1974) 등은 nalidixic acid 50mg/ml 를 *E. gracilis* 생육시 배지에 처리하면 100%의 백화 현상을 나타내었는데 이러한 현상은 nalidixic acid 가 엽록체 DNA의 복제를 완전히 억제 하였기 때문이다. Daunomycin은 진핵세포의 DNA에 작용하여 mitochondrial RNA 생합성을 억제하며(Evans, 1973), ethionine 4g을 닭의 난황에 주입하면 embryo의 크기가 감소하는

데 이는 DNA 증식이 억제되었기 때문이다(Ruddick 등, 1972). 또한 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin, ethyleneimine 등을 처리한 세포에서 DNA 합성량은 대조구에 비하여 30-60% 감소 되었고(Painter, 1978), replicon의 초기 단계를 억제한다고 보고하였다. 또 cycloheximide를 쥐의 간에 처리하면 15분 이내에 핵에서의 45S RNA 합성이 억제되었으며 핵 이외의 다른 RNA 생합성은 60분 후에야 지체 효과가 나타났다(Muramatsu, 1970). 재생하는 쥐의 간에 6~7  $\mu$ g/kg의 2'-deoxy cofomycin을 처리하면 핵

\*이 논문은 한국학술진흥재단의 1985년도 연구비에 의하여 연구되었음.

RNA 생합성이 억제(Glazer, 1978)되고 actinomycin D는 배양한 L-cell에서 45S rRNA, 5S rRNA, tRNA 합성을 저해하며(Perry, 1970), poxvirus의 복제를 제한하는 streptovaricin이 초기에 주입되면 mRNA 생합성이 억제되는 현상이(Quintrell, 1970) 관찰되었다. 이러한 많은 항생물질들 중에 특히 본 연구에서 rifampicin을 사용한 것은 원핵세포에서의 핵산 합성 저해 효과는 많이 보고 되었으나(Reid 등, 1970, Staudenbauer 등, 1972, White 등, 1971, Henry 등, 1971, Coote 등, 1973), 진핵세포에 분포된 소기관들에서 자율적으로 생성되는 핵산의 억제 현상에 관한 보고가 없기 때문이다. Rifampicin은 3-(4-methyl-1-piperazinylimino methyl) rifamycin으로 과거에는 rifaldazine(Keberle 등, 1966, Sensi, P., 1966), rimactane(Wehrli 등, 1969)이라 명명하였으며 rifamycin B로 부터 분리된 semisynthetic 항생물질로 *Streptomyces mediterrant*의 발효산물이기도 하다(Sensi 등, 1959).

Rifampicin은 in vivo와 in vitro 상태에서 RNA polymerase의 msubunit에 결합하여(Kornberg, 1980) RNA 합성 초기 과정을 완전히 억제한다. 그러므로 DNA에서 RNA로 전사되는 과정을 저해하여 RNA 생합성을 억제한다(Wehrli 등, 1969). Rifampicin은 다양한 농도로 원핵세포에 많은 저해효과를 나타내었는데 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rifampicin을 처리한 strain PB154에 EDTA를 첨가하면 정상세포 보다는 RNA 합성이 단 시간내에 99%나 억제 되었으며(Reid 등, 1970), M13 single strand 합성에서는 RNA polymerase와 특유한 상호작용으로 저해현상을 나타내고 double strand molecules의 증식을 방해하기도 한다(Staudenbauer 등, 1972). *M. Smegmatis* 배양액에 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rifampicin을 처리하면 세균 생장율이 감소되며 48시간 후면 생장이 완전히 없어지고 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 6 시간 후면 생장율이 소실 되었다. *M. Smegmatis*에서 분리한 polymerase는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rifampicin에 의해 활성도가 90%나 떨어졌다(White 등, 1971). Henry(1971)등은 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rifampicin에서는 *E. coli*가 4 분 안에 RNA 합성을 완전히 억

제하였으며, rifampicin을 처리한 *B. subtilis*에서는 95% 이상의 치사 효과를 나타내었다(Coote 등, 1973). 사람의 림프세포에서도 rifampicin을 처리하면 단백질과 DNA 합성이 억제되며(Nilsson, 1971), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rifampicin을 함유한 림프세포 배양액에서는 toxoplasma의 증식과 림프세포의 생장을 억제하였다(Remington 등, 1970). Dreissche(1970)등은 *acetobularia*의 엽록체 RNA polymerase의 활성도를 추적하기 위해 rifampicin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 whole cell 혹은 anucleate *acetobularia*에 48시간 처리하면 circadian rhythm에는 아무런 영향도 없다는 것이 발견 되었는데 이것은 circadian rhythmicity가 핵이나 엽록체의 전사에 의존하지 않기 때문이다. 이와같이 rifampicin은 세균 세포에서는 다양한 억제 현상이 보고 되었으나 고등 동물 세포에서는 그 정확한 작용기작이나 저해현상은 밝혀진 바가 없다. 그러나 whole cell system에서의 rifampicin의 효과에 관하여는 일부 보고 되었으나(Nilsson, 1971, Remington 등, 1980, Dreissche, 1970), 세포내 소기관에서 자율적으로 일어나는 핵산합성과 rifampicin의 작용에 관한 보고는 별로 없었다. 그리하여 본 연구에서는 rifampicin을 처리한 배양액에서 *Chlorella* 세포를 배양시킨 후 배양초와 배양 중간기에 일정량의 세포를 수확하여 이들 세포로부터 엽록체를 추출하여 이 과정에서 독립적으로 수행되는 핵산 합성 및 이들을 구성하고 있는 각 염기별 조성을 whole cell system과 비교하여 영향이 있는가를 추적하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### *Chlorella* 세포의 배양

*Chlorella* 세포의 생장을 저해하는 rifampicin (Sigma Chemical co U.S.A)의 농도를 정하기 위하여 여러가지 농도(10, 20, 30, 50, 80 ppm)로 처리한 M4N 배지(Tamiya 등, 1953)에 일정량의 세포를 접종한 후 32Klux의 광선을 조사하고 CO<sub>2</sub> enriched air로 bubbling 시키면서 25°C에서 배양하였다. 배양초와 배양 중간기에 세포를 수확하여 packed cell volume으로 생장율

을 추적하였으며 흡광도(540nm, 660nm, Beckman Model 24)로 엽록체의 함량 변화를 조사하였다.

#### 엽록체의 분리

일정 기간에 수확한 세포에서 엽록체 분리는 Lyttleton(1962)의 방법을 다소 변형하여 사용하였는데 엽록체 분리 순서는 다음과 같다. 수확한 *Chlorella* 세포를  $\frac{1}{500}$ M  $K_2SO_4$  용액으로 2~3 회 세척하였다. 0.05M phosphate buffer (0.4M sucrose pH7.5)와 3 배의 석영사를 넣고 4°C를 유지하면서 마쇄, 마쇄물을 150g에서 10분간 원심 분리 하였다. 얻어진 침전물을 동일한 phosphate buffer로 현탁하여 200g에서 10분간 원심분리 하였다(3~4 회). 상등액을 모아 10,000g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물인 엽록체도 보고 이들의 핵물질 오염은 Feulgen 반응으로 확인하였다.

#### 핵산 분획

배양초와 배양 중간기에 수확한 일정량의 *Chlorella* 세포를  $\frac{1}{500}$ M  $K_2SO_4$  용액으로 2~3 회 세척하였다. 세척한 세포에서 DNA는 Marmur(1961)의 방법을, RNA는 Ishihama(1962)의 방법에 의하여 분획하였다. 다음의 모든 추출 조작은 4°C하에서 수행하였다.

#### DNA 추출

*Chlorella* 세포에 2 배의 석영사를 넣고 마쇄한 다음 마쇄물에 saline EDTA(0.15M NaCl, 0.1 M EDTA, pH8.0)와 25% sodium dodecyl sulfate를 처리한 후 60°C에서 20분간 반응시켰다. 증류수와 80% phenol을 첨가하여 15분간 흔든 다음 원심분리 하였다(2 회 반복). Phenol 층에 ether와 2 배의 ethanol을 처리하고 원심분리하여 얻어진 침전물에 saline citrate(0.15M NaCl, 0.15M citrate pH7.0)로 용해시킨 후 RNase(0.2% RNase A와 100 unit RNase T1)를 첨가하여 37°C에서 3 시간 항온시킨 후 반응물에 있는 phenol을 ether로 세거하고 최종 농도가 1M이 되게 NaCl을 첨가하였다. 다음 2 배의 ethanol을 첨가 후 원심분리하여 얻은 침전물을 saline citrate(0.015M NaCl-citrate)로 용해시킨 후 3M sodium acetate(0.001M EDTA pH7.0)와 0.6배의 isopropanol을 첨가한 후 강하게 흔들고 나서 원심분리 하였다. 침전된 DNA

를 isopropanol로 2 회 처리. 80%, 90%, 100%, ethanol과 ether로 세척한 후 증발시켜 DNA를 추출하였다.

#### RNA 추출

수확한 세포를 0.05M acetate buffer(0.14M NaCl, 0.1mM  $MgCl_2$ , pH6.2)로 2 회 세척한 다음 2 배의 석영사, polyvinyl sulphate(20 $\mu$ g), 0.5% sodium dodecyl sulphate, bentonite(20 $\mu$ g/cell ml)를 첨가하여 30분간 마쇄하였다. 마쇄물에 동일한 acetate buffer와 0.5% sodium dodecyl sulphate, polyvinyl sulphate(20 $\mu$ g) bentonite(20mg/cell ml)를 첨가한 후 원심분리 하였다. 얻어진 침전물을 동일한 acetate buffer로 용해시킨 후 원심분리 하였다(2 회 반복).

상등액에 80% phenol을 처리하여 15분간 흔든 후 원심분리 하였다. 침전물에 acetate buffer를 첨가하여 원심분리 하여 얻어진 상등액에 ether, ethanol을 첨가하여 -20°C에서 일주야 방치한 후 원심분리 하였다.

침전물은 0.05M acetate buffer(0.1mM  $MgCl_2$ )로 용해시킨 후 DNase(핵산의  $\frac{1}{50}$ )를 처리하여 20°C에서 15분간 반응시킨 다음 0.02배의 2.5% bentonite를 첨가한 다음 원심분리하여 얻은 상등액에 0.03배의 3M NaCl, 2 배의 cold ethanol을 첨가 후 원심분리 하였다. 침전물을 ethanol로 세척하고 0.05M acetate buffer(0.1 mM  $MgCl_2$ , polyvinyl sulphate(2 $\mu$ g/ml))로 용해시킨 후 2~3 시간 방치한 후 생성된 침전물을 원심분리하여 RNA를 추출하였다.

#### RNA polymerase 활성 측정

배양초와 배양말에 수확한 *Chlorella* 세포를  $\frac{1}{500}$ M  $K_2SO_4$  용액으로 2~3 회 세척하였다. 세척한 세포에서 RNA polymerase 활성을 Maitra 등(1967)의 방법을 다소 변형하여 사용하였는데 그 추출 순서는 다음과 같다. 모든 반응은 0~4°C에서 수행하였으며 Tris-buffer 용액은  $10^{-3}$ M EDTA,  $10^{-2}$ M 2-mercaptoethanol을 혼합시켰다.

#### Crude extract

세척한 세포에 2 배의 석영사와 0.02M Tris-HCl buffer(20% sucrose, 0.01M  $MgCl_2$ , pH8.0)를 2 배 첨가한 후 30분간 마쇄한 다음 원

심분리 (10, 000g, 10분)하여 얻은 상등액을 다시 초원심분리 (78, 000g, 40분)하여, 얻어진 상등액을 crude extract 라고 하였다.

#### Ammonium sulfate precipitation

추출된 crude extract 에 0.5% protamine sulfate 를 처리하여 10분간 혼든 후 원심분리 (10, 000g, 10분)하였다. 침전물을 0.1M potassium succinate buffer (pH6.0)로 세척하고 원심분리하여 얻은 침전물을 0.3M ammonium sulfate (pH8.0)로 용출시킨 후 고체인 ammonium sulfate 를 첨가하여 25% 포화용액을 만든 후 10분간 혼들고 초원심분리 (78, 000g, 30분) 하였다. 상등액을 다시 ammonium sulfate 로 50% 포화용액을 만든 후 초원심분리 (78, 000g, 30분)하여 얻어진 침전물을 0.05M Tris-HCl buffer (pH8.0)로 용해시킨 다음 동량의 glycerol 을 첨가하였다.

#### First DEAE cellulose chromatography

위에서 얻은 sample 을 0.02M Tris buffer (pH8.4)로 2 시간 동안 투석 하였고 DEAE cellolose column (25×10cm)은 0.02M Tris buffer (pH8.4)로 equilibrium 시키고나서 투석한 sample 을 column 에 넣고 여기에 0.02M Tris-HCl buffer (pH8.4)와 여러가지 농도의 pH8.4 인 ammonium sulfate (0.02M, 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.5M, 1.0M)용액을 가하여 column 을 통해 흘러 나오는 sample 을 2ml 의 glycerol 이 포함된 시험관에 5ml 씩 받았다. 이와같이 얻은 sample 에서 각각의 농도에 포함된 효소의 활성도와 단백질량을 측정하여 최고 활성을 나타낸 것은 다음 과정에 사용하였다.

#### Second DEAE Cellulose Chromatography

Second DEAE Cellulose Column 은 0.02M Tris-HCl buffer (pH8.4, 20% glycerol)로 equilibrium 시켰다. First DEAE cellulose 에서 활성도가 높은 sample 은 0.02M Tris-HCl buffer 2l 로 1.5시간 투석시킨 다음 이들 투석된 sample 을 column 에 넣고 20% glycerol 이 함유된 각 용액 {0.02M Tris-HCl buffer pH8.4, ammonium sulfate pH7.4 (0.02M, 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.35M, 0.5M)}을 가하여 column 을 통해 나온 sample 을 시험관에 각 5ml 씩 채취하였다. 이와같이 얻은 sample 에서 각각의 농도

에 함유된 효소의 활성도와 단백질량을 측정 하였다. 활성도가 최고인 ammonium sulfate 농도의 효소를 RNA polymerase 로 보고 본 실험에 사용하였다.

#### 분 석

##### DNA 와 RNA 함량 측정

분리된 DNA 와 RNA 는 Marskak 와 Vogel (1951)의 방법으로 가수분해 하였다. 즉 추출된 핵산은 40~60°C에서 건조시킨 후 72% perchloric acid 를 가하여 100°C에서 1 시간 가열하였다. 냉각시킨 후 증류수를 동량 첨가하여 원심분리 시켰다. 얻어진 상등액에 함유된 각 염기별 흡광도를 *李와 石*(1984)에서 사용된 최대 흡수과장에 따라 측정된 후 cell mg 당 mg 으로 환산하였다.

##### RNA polymerase 활성도 변화

추출된 RNA polymerase 의 활성도는 Maitra 등(1967) 방법을 변형하여 260 nm 에서 흡광도를 측정하여 O.D. 값으로 환산하였다. 단백질 함량은 Lowry method(1951)에 의하여 cell mg 당 단백질 mg 으로 환산하였다.

## 결 과

### *Chlorella* 세포의 생장율

*Chlorella* 세포의 생장을 억제하는 rifampicin 의 농도는 80ppm 으로 나타났다. rifampicin (80 ppm)을 처리한 M4N 배지에 *Chlorella* 세포를 7 일간 배양하여 얻어진 결과를 Fig.1에 나타내었다. Fig.1에 표시된 바와 같이 배양초에는 대조구와 처리구는 비슷한 경향을 보였으나 배양 후 4 일부터 처리구가 대조구에 비하여 현저히 감소되어 배양 말기에는 40%의 생장억제 효과를 보여 주었다.

### DNA 염기 함량 변화

Whole cell system 에서 DNA 염기 함량은 Table 1, Fig.2에 분리한 염록체에서의 DNA 양적동태는 Table 1, Fig.3에 표시하였다. Rifampicin 을 처리한 whole cell system DNA 에서의 염기함량은 대조구에 비하여 배양 2 일 후부터 처리구는 현저한 억제현상을 나타내었다. 배양 말기 처리구는 adenine 65%, guanine 70%, cytosine 72%, thymine 70% 감소로 억제 효과

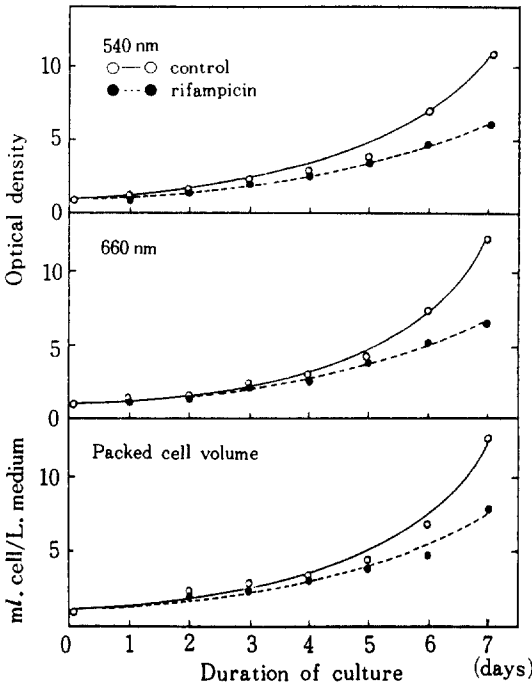


Fig.1. Growth ratio of *Chlorella* cells during the culture treated with rifampicin.

를 볼 수 있었다. 분리한 엽록체에서의 DNA 염기량은 배양초부터 심한 저해 현상을 나타내었다. 배양말기 처리구가 대조구보다 adenine 56%, guanine 64%, cytosine 61%, thymine 56%로 저해 현상을 나타내었다. 이와같은 양적 동태로 보아 whole cell system 과 분리한 엽록체에서의 DNA 합성시 rifampicin 의 저해 작용은 거의 비슷한 결과로 관찰 되었다.

**RNA 염기 함량 변화**

Whole cell system 에서의 RNA 염기 함량 변

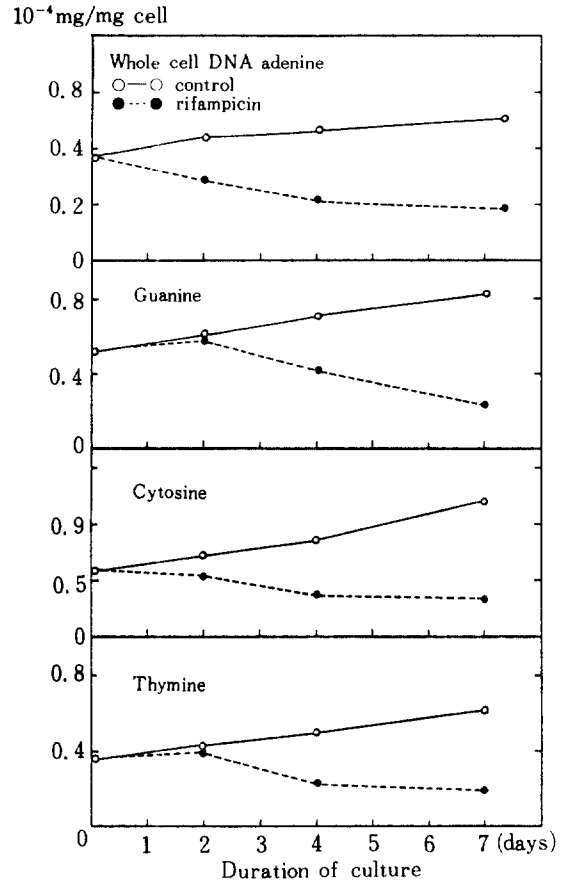


Fig.2. Changes in amounts of base composition of DNA in whole cell system treated with rifampicin during cultivation.

화는 Table 2, Fig.4에 분리한 엽록체에서의 변화는 Table 2, Fig.5에 나타내었다. Whole cell system 에서 RNA 생합성에 미치는 rifampicin 의 저해현상을 관찰할 수 있었다. 처리구는 2 일

Table 1. Changes in amounts of base composition of DNA in whole cell system and chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with rifampicin during cultivation.

Days of culture	Whole cell system										Chloroplast									
	Control					Rifampicin					Control					Rifampicin				
	A	G	C	T	total	A	G	C	T	total	A	G	C	T	total	A	G	C	T	total
0	0.38	0.52	0.58	0.37	1.85	0.38	0.52	0.58	0.37	1.85	0.96	2.28	1.84	1.44	6.52	0.96	2.28	1.84	1.44	6.50
2	0.43	0.60	0.64	0.42	2.09	0.33	0.59	0.52	0.39	1.83	1.02	2.52	2.14	1.56	7.24	0.81	1.85	1.62	1.22	5.50
4	0.47	0.71	0.72	0.50	2.40	0.22	0.42	0.35	0.23	1.22	1.12	2.76	2.22	1.68	7.78	0.37	0.54	0.79	0.55	2.25
7	0.54	0.83	1.17	0.61	3.15	0.19	0.24	0.33	0.19	0.95	1.22	2.98	2.41	1.84	8.45	0.54	1.08	0.94	0.81	3.37

A:adenine, G:guanine, C:cytosine, T:thymine

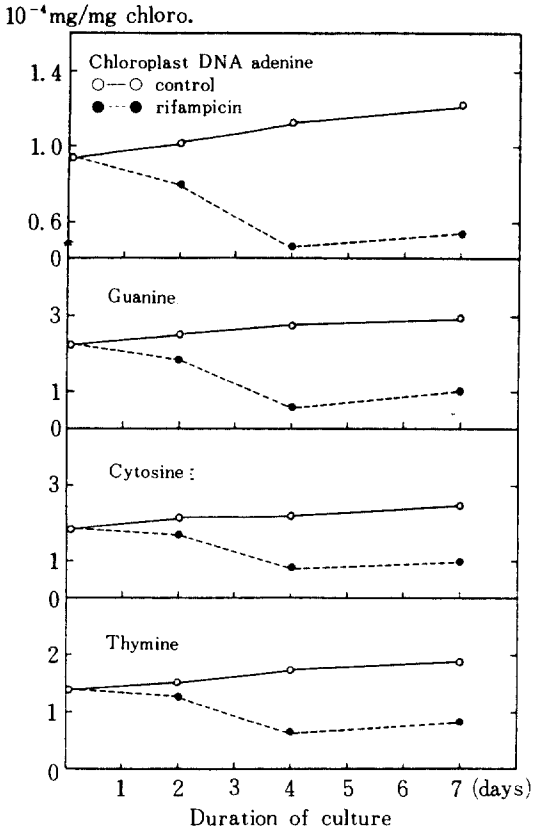


Fig.3. Changes in amounts of base composition of DNA in chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with rifampicin during cultivation.

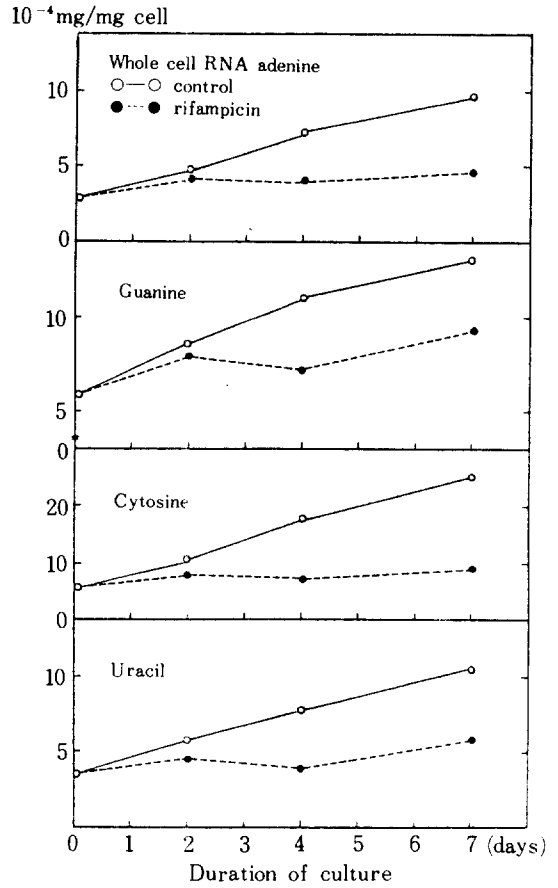


Fig.4. Changes in amounts of base composition of RNA in whole cell system treated with rifampicin during cultivation.

부터 현저한 억제 현상을 보여 주어 배양 말기에 adenine 51%, guanine 28%, cytosine 69%, uracil 44%로 저해를 나타내었다. 분리한 염록체에서도 배양 초기부터 처리구는 대조구에 비하여

심한 저해효과를 나타내어 결국 배양 말기에는 adenine 80%, guanine 67%, cytosine 86%, uracil 77%로 저해 효과가 관찰되었다. 이러한

Table 2. Changes in amounts of base composition of RNA in whole cell system and chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with rifampicin during cultivation.

Days of culture	Whole cell system										Chloroplast									
	Control					Rifampicin					Control				Rifampicin					
	A	G	C	U	total	A	G	C	U	total	A	G	C	U	total	A	G	C	U	total
0	2.87	5.94	5.56	3.64	18.01	2.28	5.94	5.56	3.64	17.42	4.92	11.88	7.97	6.23	31.00	4.92	11.88	7.97	6.23	31.00
2	4.73	8.75	10.31	5.64	29.43	3.98	7.96	6.74	4.74	23.42	7.12	12.24	11.07	7.43	37.86	2.47	5.41	4.79	3.09	15.76
4	7.04	11.14	17.06	7.96	43.20	3.52	7.23	6.30	4.26	21.31	8.32	12.83	15.07	9.05	45.27	4.08	9.75	5.89	5.21	24.93
7	9.47	13.2	24.54	10.54	57.75	4.66	9.44	7.53	5.89	27.52	9.32	13.58	21.78	10.83	55.51	1.91	4.46	3.07	2.50	11.94

A:adenine, :guanine, C:cytosine, U:uracil

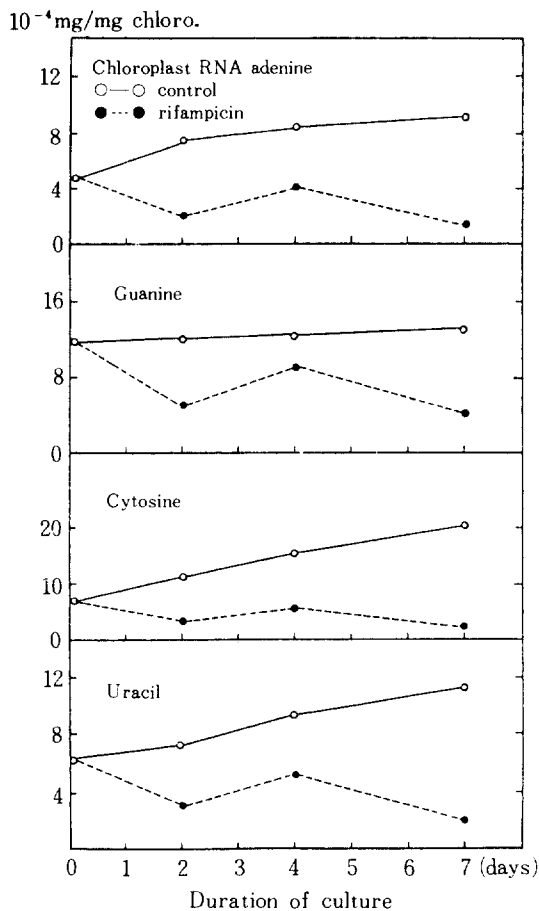


Fig. 5. Changes in amounts of base composition of RNA in chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with rifampicin during cultivation.

Table 3. RNA Polymerase activity in whole cell system and chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with rifampicin.

Source of polymerase	Duration of culture	Crude extract		Second DEAE cellulose fraction	
		D RNA polymerase activity* 260nm (O. D.)	Protein (mg/ml)**	RNA polymerase activity* 260nm (O. D.)	Protein (mg/ml)**
Whole cell system	start	0.062	0.025	0.036	0.029
	control (after 7th day)	0.014	0.029	0.012	0.048
	treated rifampicin (after 7th day)	0.134	0.030	0.015	0.041
Chloroplast	start	0.025	0.004	0.028	0.004
	control (after 7th day)	0.035	0.005	0.036	0.005
	treated rifampicin (after 7th day)	0.030	0.004	0.034	0.004

\*one O. D. of enzyme activity is defined as that amount causing transformation of 20μg of substrate per 10mins. at 37°C under optimal conditions of measurement.

\*\*mg/ml : mg protein per ml enzyme.

결과로 볼 때 RNA 생합성시 rifampicin은 whole cell system 보다는 분리한 엽록체에 현저한 억제 효과를 나타내었음을 관찰할 수 있었다.

RNA polymerase 의 활성도

Rifampicin 을 처리한 M4N 배지에 *Chlorella* 세포를 배양하여 배양초와 배양 말기의 대조구와 처리구에서 RNA polymerase 를 추출하였다. Whole cell system 과 분리한 엽록체에서 추출한 crude extract 와 second DEAE cellulose fraction 은 Table 3에 나타내었다. 추출한 crude extract 에서 볼 수 있듯이 whole cell system 에서 효소 활성화는 대조구에서는 현저히 증가하였으나 처리구에서는 대조구에 비해 10% 감소량을 나타내었다. 분리한 엽록체에서도 효소 활성화를 볼 수 있었는데 처리구는 대조구보다 42% 억제 현상을 나타내었다. 단백질 함량에서 또한 현저한 감소량을 볼 수 있었다. 추출한 second DEAE cellulose fraction 에서도 효소 활성화와 단백질 함량의 저해 현상이 뚜렷하게 관찰되었다. Whole cell system 에서 배양초에 비해 배양 말기의 처리구는 대조구에 비해 9% 억제 효과를 나타내었다. 분리한 엽록체에서도 소량의 효소 활성화와 단백질량이 관찰되었는데 배양 말기 처리구는 대조구에 비해 효소 활성도는 31%, 단백질 함량은 90% 감소하였다. 이와같은 결과로 rifampicin 은 *Chlorella* 세포내의 RNA polymerase 의 활성도에 현저한 억제 현상을 나타냄을 볼 수 있었다. 특

히 분리한 염록체에서 RNA polymerase 활성도 억제에는 매우 뚜렷하였다.

## 고 찰

Mcclure 와 C'ech(1978)는 *E. coli* 에서 rifampicin 이 轉座 과정을 전체적으로 억제한다고 보고 하였다. 그러나 DNA strand 의 elongation 에는 아무런 저해현상도 나타나지 못함을 관찰하였다(Hartman 등, 1967). *M. Smegmatis* 를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rifampicin 이 처리된 배지에 생육시켰을 때 세균 생장은 억제되어 생존량이 떨어지며 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rifampicin 농도에서는 L-Cell 생장이 억제된다(Remington 등, 1970)는 보고가 있었다. *Chlamydomonas reinhardi* 에서는 rifampicin 이 250ppm 농도에서 세포 분열이 13% 억제되었고 *E. coli* 배양 조건에 10ppm 의 rifampicin 을 처리하면 세포 증식이 완전히 억제 되었다(Byfield 등, 1970). 이와같이 생물에 따라 각기 다른 농도에서 대사 작용에 저해를 일으킨 것이 조사되었는데 본 연구에서도 80ppm 의 농도에서 배양 후 5 일째 부터 성장 억제가 관찰되었으며 DNA, RNA 합성량은 배양 후 2 일째와 배양 초기에 저해 현상을 나타내었는데 이러한 결과는 세포질 대사가 핵 대사 이후에 일어나기 때문에(Robertis, 1981), 본 연구에서도 세포 분열에 우선하여 핵산 합성이 일어나는 과정을 항생제가 억제하였기 때문이라 생각된다. 세균세포 같은 원핵 세포에서는 rifampicin 이 낮은 농도로 생장의 저해 작용을 일으킬 수 있었으나 algae 같은 진핵세포에서는 세균 세포보다 높은 농도의 rifampicin 에서 성장 억제를 일으킨다는 것을 알 수 있었다. Nilsson(1971)은 사람의 결핵 반응을 조절하는 세포를 rifampicin 에 처리하면 DNA 합성 뿐만 아니라 단백질 합성 또한 억제한다고 하였으며 RNA 합성의 저해제가 존재할 때 deoxyadenylate 가 DNA 합성을 자극한다 할지라도 DNA 증가량은 40%를 초과하지 않는다(Soska 등, 1974)고 하였다. 또한 rifampicin (50mg/ml)을 처리하고 UV 에 노출시키면 세균세포 내에서 DNA 복제는 저해현상을 나타내는데 이는 rifampicin 이 DNA 복제의 재개시를 막으므로

rifampicin 이 존재할 때 DNA 는 50%만이 증가한다(Doudeny 등, 1973). 일반적으로 세포내 핵에서 핵산 합성 과정을 보면 먼저 ribonucleotide 가 합성되고 계속해서 deoxyribonucleotide 로 변해진 다음 DNA 복제가 일어나고 연이어 그 DNA 를 주형으로 하여 RNA 가 합성되는데 rifampicin 은 DNA 로 부터 RNA 로 전사되는 과정을 억제하여 RNA 합성량을 감소시킨다고 알려져 있다(Kornberg, 1980).

이와같은 결과는 본 연구에서도 DNA 의 염기 함량이 배양 후 2 일째 부터 저해효과가 나타나 배양 말기에는 whole cell system 뿐만 아니라 분리한 염록체의 DNA 염기 함량이 특히 cytosine 에서 심한 rifampicin 의 억제 효과가 관찰 되었다. RNA 염기 함량은 배양 초부터 억제 현상을 나타내었으며 배양 말기에는 whole cell system 과 분리한 염록체에서 rifampicin 의 저해 효과가 특히 cytosine 에서 나타난 바 핵산 합성시 rifampicin 은 DNA 보다는 RNA 합성을 억제하는 것과 일치하였다. 이는 rifampicin 이 DNA 에서 RNA 로 전사되는 과정을 억제하므로 RNA 의 adenine, guanine, cytosine, uracil 의 4 개 base 는 더욱 심한 억제현상을 나타내었으며 DNA 의 adenine, guanine, cytosine, thymine base 는 일련의 핵산 합성 과정에 따라 다소 늦게 저해 효과를 나타내었다.

Gamble 과 Mcclure(1970)는 bovin heart mitochondria 에 40  $\mu\text{g}/\text{mg}$  의 rifampicin 을 처리하면 모든 RNA 합성은 처음 5~8 분 내에 일어나며 단백질 합성은 15분 동안만 합성되는데 이것은 모든 RNA polymerase 가 rifampicin 에 의해 억제되었고 단지 이전에 생성된 mRNA 가 전사되어 단백질이 합성되었다. 본 실험에서 사용한 *Chlorella* 세포에서 rifampicin 의 RNA 합성 저해 현상은 algae 인 *acetabularia* 세포를 rifampicin 에 처리하였을 때 RNA 합성이 보다 현저히 영향을 받는다(Driessche 등, 1970)는 보고와 일치한다.

또한 *B. subtilis* 와 *Clostridium audiuirici* (Murray 와 Rabinowitz, 1981), *Teramena* 와 L-1210 cell (Byfield 등, 1970)에 rifampicin 을 처리하면 RNA polymerase 활성을 저해시키



RNA 합성율이 감소된다는 보고와도 동일한 현상을 나타내었다.

30  $\mu\text{g/ml}$  rifampicin 이 *E. coli* 의 단백질 합성에 영향을 주며 rifampicin 을 처리한 *rpo cI* 돌연변이체는 RNA polymerase 가 promoter 나 다른 조절인자와 상호작용을 한다(Gorlenko, 1979)고 하였다. *M. bovis* str BCG 725-Prague 와 *M. smegmatis* str 607의 RNA polymerase 는 rifampicin 에 내성을 갖는데 이는 *mycobacterial* strs 의 세포벽 구성물에 조금씩 다르기 때문이다. Rifampicin 을 세포에 처리하면 핵산은 uridin 이 RNA 로 통합되는 것을 완전히 억제하며 (Galling, 1971), 0.1g/l 의 rifampicin 농도에서는 불안정한 mRNA 가 non-hybridizable product 를 20%나 감소시켰다(Gray, 1971).

본 연구에서 rifampicin 이 분리된 엽록체의 RNA 합성에서도 심한 억제현상을 나타내었는데 이러한 결과는 Gray(1971)의 보고와 일치하였다. Goodenough(1971)는 *Chlamydomonas reinhardtii* 에서 rifampicin 이 엽록체의 크기를 감소시켰으며 광합성율도 80%나 저해 시켰고 엽록체 내의 ribosome 이 84%, 세포질내 ribosome 이 80%나 감소되어 RNA 와 단백질 합성시 저해 작용을 일으켰으나 mitochondria 에서는 이러한 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 *Saccharomyces cerevisiae* (Wintersberger, 1970), *Chlorella pyrenoidosa* (Galling, 1972)에서 분리한 mitochondria 의 RNA 합성에도 rifampicin 의 억제 효과는 나타나지 않았다.

반면 李와 趙(1984)는 *Chlorella ellipsoidea* 에서 분리한 엽록체의 RNA 합성에 tubercidin 이 저해작용을 한다고 하였으며, Michalis(1973)등은 *Saccharomyces cerevisiae* 에서 nalidixic acid 가 핵막보다 특히 mitochondria 막을 잘 투과한다고 하였다. 이와같은 결과를 고찰할 때 항생물질이 생물에 따라 세포막 투과율이 특히 원형질막과 소과립체막의 투과율이 각기 다르다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 분리한 엽록체의 DNA, RNA 합성은 배양 초기부터 억제되어 배양 말기에는 cytosine 이 DNA 에서 61%, RNA 에

서 86%로 다른 염기를 보다 심한 저해 현상을 보였다. Whole cell system 에서는 배양 2 일째 부터 억제되다가 배양 말기에는 특히 cytosine 이 DNA 와 RNA 에서 각기 72%, 69% 억제로 다른 염기들 보다 rifampicin 의 저해 효과를 민감하게 나타내었다. 그러므로 분리한 엽록체의 핵산 합성에 rifampicin 은 더욱 현저한 저해 현상을 나타내었다. Bacterial RNA polymerase 의 특유한 저해제는 streptoglydigin, rifampicin, liframycin 등인데 DNA 복제를 억제할 뿐만 아니라 RNA, DNA 합성 또한 제한하였다(Sudha 등, 1981).

Rifampicin 의 stoichiometric amounts 에 결합할 수 있는  $\beta$  는  $\alpha_2\beta$  subassembly 를 형성하여 저장되기도 하며  $\beta$ ,  $\beta^2\alpha$ ,  $\beta\beta'$ ,  $\alpha_2\beta'$  는 rifampicin 에 결합하지 못하고 6M guanidine hydrochloride 로 변성된 RNA polymerase 는 stoichiometric amounts rifampicin 에 결합할 수 있으나 DNA 에는 결합하지 못한다(Lowe 등, 1976). RNA 뿐만 아니라 DNA 합성에 저해 효과를 나타낸 것이 본 연구의 결과와 일치하였다. 고농도의 rifampicin 에서 변성된 RNA polymerase 를 갖는 *E. coli* mutant 는 30°C에서 생장이 멈추며 효소 활성 또한 변성되어 나타났다(Reid, 1971). Bacteriophage M13 의 single strand DNA 합성시에는 rifampicin 과 RNA polymerase 가 직접 작용하여 생합성율을 감소시켰다(Staudenbauer 등, 1972).

이와같은 이미 보고된 바 처럼 본 연구에서는 rifampicin 이 whole cell system 과 마찬가지로 분리한 엽록체에서 RNA 생합성 감소는 RNA 를 구성하고 있는 4 개의 base 함량 감소 보다는 DNA 에서 RNA 로 전사되는 과정을 억제하여 RNA 생합성율이 저해된 것은 Kornberg(1980)의 보고와도 일치한다. 그러나 DNA 도 RNA 와 비슷한 억제 현상을 나타낸 것은 ribonucleotide 에서 deoxyribonucleotide 로 변개될 때 rifampicinol 억제작용을 하였는지 또는 deoxyribonucleotide 가 DNA 를 구성할 때 저해작용을 하였는지는 앞으로 더 연구하여야 할 과제라 생각한다.

## 적 요

*Chlorella ellipsoidea* 를 rifampicin 이 함유된 M4N 배지에 7 일간 배양하였다. 배양기간 동안에 일정량의 세포를 수확하여 생장율을 측정하였다. 이들 세포에서 분리된 엽록체로부터 핵산과 RNA polymerase 를 추출하여 함량을 염기별로 분석, 활성도를 측정하여 핵산 합성에 미치는 rifampicin 의 효과를 대조구와 비교하며 분석하였다. 생장 억제 효과를 나타내는 rifampicin 의 농도는 80ppm 이었다. Whole cell system 과 분리한 엽록체에서의 DNA 합량은 대조구에 비해 각각 70%, 60%의 감소를 나타내었다. Rifampicin 은 RNA 염기 함량도 whole cell system 에서는 46% 억제되었고 분리한 엽록체에서는 77% 저해효과가 관찰되었다. Rifampicin 에 의한 RNA polymerase 활성도는 whole cell system 에서는 10% 감소, 분리한 엽록체에서는 42% 억제를 나타내었다.

## REFERENCES

1. Byfield, J.E., Y.C. Lee, and L.R. Bennett, 1970. Similarity of Tetrahymena and mammalian RNA polymerase based on rifampicin resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 601-613.
2. Coote, J.G., D.V. Wood, and J. Mandelstam, 1973. *Bacillus subtilis* as a complicating factor in the assessment of the life time of messenger ribonucleic acid. *Biochim. J.*, **134** (1), 263-270.
3. Doudney, C.O., 1973. Rifampicin limitation of DNA synthesis in ultraviolet-damaged bacteria: evidence for post-irradiation replication synchrony. *Biochim. Biophys. Acta*, **312** (2), 243-247.
4. Driessche, T.V., S. Bonotto, and J. Brachet, 1970. Inability of rifampicin to inhibit circadian rhythmicity in *Acetabularia* despite inhibition of RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 631-634.
5. Evans, I., D. Linstead, P.M. Rhodes, D. Linstead, P.M. Rhodes, D. Wilkie, 1973. Inhibition of RNA synthesis in mitochondria by daunomycin. *Biochim. Biophys. Acta*, **312** (2), 323-336.
6. Galling G., 1971. Influence Rifampicin, Chloramphenicol and Cycloheximide on Uridine-Incorporation into Chloroplast ribosome precursors of *Chlorella*. *Planta*, **98**, 50-62.
7. Galling, G., 1972. Incorporation of uridine and of orotate into chloroplast ribosome RNA of *Chlorella* after treatment with antibiotics. *Arch. Mikrobiol.*, **81**, 245-259.
8. Gamble., J.G., and R.H., Mccluer, 1970. In vitro studies with Rifampicin on the stability of heart mitochondrial RNA. *J. Mol. Biol.*, **53**, 557-560.
9. Glazer, R.I., 1978. The effects of 2-deoxycoformycin on the action of cordycepin on nuclear RNA synthesis in regenerating liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46** (1), 191-197.
10. Goodenough, U.W., 1971. The effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on chloroplast structure and function in wild type *chlamydomonas reinhardi*. *J. Cell. Biol.*, **50**, 35-49.
11. Gorlenko, Zh. M., V.M. Aphanasiev, and V.R. Yarulin, 1979. Effect of rifampicin and RNA polymerase changing mutation on the spectrum of proteins, synthesized in *Escherichia coli* cells. *Mol. Biol.*, **13** (6), 1350-1359.
12. Gray, W.T.H., and J.E.M. Midgley, 1971. The control of ribonucleic acid synthesis in bacteria: the synthesis and stability of ribonucleic acid in rifampicin-inhibited cultures of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **122**, 161-169.
13. Hartmann, G., K.O. Honikel, F. Knusel, and J. Nuesch, 1967. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim. Biophys. Acta*, **145**, 843-844.
14. Henry, E., L. Thomas, and G. Jonathan, 1971. ppGpp formation in *Escherichia coli* treated with Rifampicin. *J. Bacteriol.*

- Chem.*, **246** (19), 6121-6125.
15. Ishihama, A., M. Nobuk, M. Takei, E. Otaka, and S. Osawa, 1962. Molecular and metabolic properties of messenger RNA from normal and Ti-infected *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **5**, 251-264.
  16. Keberle, H., H.M. Brunot, and K. Schmid, 1986. Pharmacokinetic and metabolic studies with labeled rifampicin antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **30**, 365-370.
  17. Kornberg, 1980. DNA replication. W.H. Freeman and company, 415-441.
  18. 이종삼, 석영애, 1983. *Chlorella* 세포에서 분리한 엽록체의 핵산합성: Nalidixic acid의 영향에 관하여, 한국미생물학회지, **21**(4), 197-206.
  19. 이종삼, 조선희, 1984. *Chlorella* 세포에서 분리한 엽록체의 핵산합성: Tubercidin의 영향에 관하여, 성신기초과학연구지, **1**, 61-72.
  20. Lowe, P.A., A.D.B. Malcolm, 1976. Rifampicin binding as a probe for subunit interactions in *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **454**(1), 129-137.
  21. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Sarr and R.J. Ranball, 1951. Protein measurement was Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
  22. Lyttleton, J.W., 1962. Isolation of ribosome form spinach chloroplast. *Exp. Cell. Res.*, **26**, 312-317.
  23. Maitra, U., and J. Hurwitz, 1967. *J. Biol. Chem.*, **242**, 4987.
  24. Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.
  25. Marshak, A., and H.J. Vogel, 1951. Microdetermination of purines and pyrimidines in biological materials. *J. Biol. Chem.*, **189**, 567-605.
  26. McClure, W.R., and C.L. Cech, 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **253** (24), 8949-8956.
  27. Michels, C.A., J. Blamire, B. Goldfinger, and J. Marmur, 1973. Studies on the action of Nalidixic acid in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Anti. Agents Chem.*, **3**(5), 562-567.
  28. Muramatsu, M.N. Shimada, T. Higashinakagawa, 1970. Effect of cycloheximide on the nuclear RNA synthesis in rat liver. *J. Mol. Biol.*, **53**, 91-106.
  29. Murray. C.L., and J.C. Rabinowitz, 1981. RNA polymerase from clostridium acidurici; Characterization of a naturally occurring rifampicin-resistant bacterial enzyme. *Ibid.* **256** (10), 5153-5161.
  30. Nilsson, B.S., 1971. Rifampicin an immunosuppressant. *Lancet*, **2**, 374.
  31. Painter, R.B., 1978. Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin, and ethyleneimine. *Cancer. Res.*, **38**, 4445-4449.
  32. Perry, R.P., and D.E. Kelley, 1970. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic-dose-response of different RNA species. *J. Cell. Physiol.*, **76**, 127-140.
  33. Pienkos, P., and A. Walfield, 1974. Effect of nalidixic acid on *Euglena gracilis*: induced loss of chloroplast deoxyribonucleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165** (2), 548-553.
  34. Quintrell, N.A., and B.R. McAuslan, 1970. Inhibition of poxvirus replication by streptovaricin. *J. Virol.*, **6**, 485-491.
  35. Reid, P., and J. Speyer, 1970. Rifampicin inhibition of ribonucleic acid and protein synthesis in normal and ethylenediaminetetraacetic acid treated *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **104**, 376-389.
  36. Reid, P., 1971. Isolation of cold sensitive -rifampicin resistant. RNA polymerase mutants of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 737-744.
  37. Remington, J.S., T. Yagura, and W.S. Robinson, 1970. The effect of rifampin on *Toxoplasma gondii*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **135**, 167-172.
  38. Robertis, D., 1981. Essentials of cell and

- Molecular biology. Philadelphia, 223-226.
39. Ruddick, J.A., and M.N. Runner, 1972. Ethionine as a depressant of synthesis of and source of label of DNA in chick embryos. *Teratology*, **5**, 353-360.
  40. Sensi, P., N. Maggi, S. Furesz, and G. Maffii, 1966. Chemical modifications and biological properties of rifamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 699-714.
  41. Sensi, P., and P. Margalith, and M.T. Timbal, 1959. Rifamycin: a new antibiotic preliminary report. *Farm. Ed. Sci.*, **14**, 146-147.
  42. Staudenbauer, W.L., and P.H. Hofschneider, 1972. Replication of Bacteriophage M13: Inhibition of single-strand DNA synthesis by Rifampicin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69** (6), 1634-1637.
  43. Soska, J., and V. Kuhrova, 1974. Effect of rifampicin and free amino acids on replication of DNA in *Lactobacillus acidophilus*. *Folia Microbiol.* **19** (5), 358-366.
  44. Sudha, B.H., and N. Sarkar, 1981. Inhibition of Deoxyribonucleic acid replication in *Bacillus brevis* by ribonucleic acid polymerase inhibitors. *J. Bacteriol.*, 1442-1444.
  45. Tamiya, H., K. Shibata, T. Iwamura, T. Sasa, and Y. Morimura, 1953. Effect of diurnally intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, **600**, 76-81.
  46. Wehrli, W., and M. Staehelin, 1969. The rifamycins: relation of chemical structure and action on RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta.* **182**, 24-29.
  47. White, R.J., G.C. Lancini, and L.G. Silvestri, 1971. Mechanism of action of Rifampicin on *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, **108** (2), 737-741.
  48. Wintersberger, E., 1970. DNA-dependent RNA polymerase from mitochondria of a cytoplasmic "petit" mutant of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40** (5), 1179-1184.

(Received July, 15, 1986)