

# *Chlorella*細胞에서 分離한 葉綠體의 核酸合成 I

—Nalidixic Acid의 影響에 關하여—

李 鍾 三 · 石 英 愛

(誠信女子大學校 自然科學大學 生物學科)

## Biosynthesis of Nucleic Acid in Chloroplast Isolated from *Chlorella* Cells. I.

—On the Effect of Nalidixic Acid—

Lee, Chong-Sam and Young-Ae Suk

(Department of Biology, College of Natural Sciences, Sung Shin Women's University)

### ABSTRACT

For the purpose of investigating the effect of nalidixic acid on the nucleic acid synthesis in chloroplast isolated from *Chlorella ellipsoidea*, cells were cultured in the media treated with nalidixic acid(20ppm) for 5 days.

Aliquots cells were taken out at the inoculation and at intervals during the culture and growth rate of *Chlorella* cells measured. After extraction of nucleic acids in chloroplast isolated from these cells, their contents were analyzed by the base composition and the effect of nalidixic acid on the nucleic acid synthesis interpreted to compare with those of the control.

1. It was showed that the inhibitory concentration affected by nalidixic acid on the growth of *Chlorella* cells were 20ppm.
2. Because nalidixic acid had depressed the DNA replication in isolated chloroplast as well as whole cell system, these contents were markedly decreased in comparison with those of the control.
3. In the isolated chloroplast as well as in the whole cell system, nalidixic acid was decreased contents of base in the RNA by preventing RNA transcription.

### I. 緒 論

Nalidixic acid(1-ethyl-1, 4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid)는 Lesher등 (1962)에 의해 合成된 naphthyridine 誘導體로서 廣範圍한 항박테리아의 能力을 가지며(Deitz등, 1964) 특히 사람을 包含한 여러 動物에서 gram-negative 細菌에 의한 泌尿器 感染 處理에 效果가 있음이 報告되었다. (Lishman과 Swinney, 1963, Froelich등, 1964)

여러가지 細菌細胞內에서 核酸이 合成될 때 nalidixic acid가 阻害作用을 한다는 것이 많이 研究되어 왔다.

*E. coli* bacteriophages  $T_5$ ,  $\lambda$ ,  $T_7$ ,  $\phi R$ 은 生長時 nalidixic acid에 의해 顯著하게 抑制되는 반면, *Bacillus subtilis* bacteriophages sp82, sp50,  $\phi 29$ 는 比較的 影響받지 않는다는 事實이 報告되었다. (Baird등, 1972)

*E. coli*에서는 nalidixic acid가 DNA合成을 抑制하나 RNA, 蛋白質, 脂質 合成에는 抑制效果를 나타내지 않는다는 것이 밝혀졌다. (Goss등, 1965) 또한 Winder와 Barber(1973)는 *Micobacterium smegmatis*에서도 nalidixic acid가 DNA合成을 抑制시키나 酵素 合成에는 效果가 없다는 것을 調査하였다. 그러나 *Chlamydia psittaci*에서는 DNA 合成 抑制는 勿論 RNA, 蛋白質 合成을 모두 抑制한다고 하였으며(Bauernfeind등,

1965, Tribby 등, 1973) 酵母細胞(Michels 등, 1973)와 bacteriophages에서도 nalidixic acid가 DNA, RNA, 蛋白質 合成을 抑制한다는 것이 指摘된 바 있다. (Taketo와 Watanabe, 1967) 아울러 *E. coli*系列에서 nalidixic acid가 蛋白質의 形態를 變形시키기도 한다는 事實이 糾明되었고 (Chao, 1977) *Euglena gracilis*에서는 이 抑制劑에 의해 葉綠體의 複製가 妨害되어 chlorosis가 일어난다는 것이 알려졌다. (Lyman, 1967, Ebringer, 1970)

이와같이 nalidixic acid는 여러가지 沮害作用을 나타내고 있으나 그 正確한 作用기작에 대해서는 아직까지 밝혀진 바 없다. 特히 whole cell system에서는 nalidixic acid의 抑制 效果가 調査되었으나 自律的으로 核酸을 合成할 수 있는 細胞內小器官에서는 이 沮害劑가 鹽基組成에 어떠한 影響을 나타내는지 아직까지 論議된 바가 거의 없다.

따라서 本 研究에서는 nalidixic acid를 處理한 培地에 *Chlorella ellipsoidea*를 培養하여 이들 細胞로부터 葉綠體를 抽出하여 이 顆粒體에서 獨立的으로 合成되는 核酸 含量 및 이들을 構成하고 있는 各 鹽基組成을 whole cell system과 比較하여 이 沮害物質이 核酸 合成에 어떠한 影響이 미치는 가를 追跡하고자 한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 生長率 및 葉綠素 含量

nalidixic acid(Sigma chemical Co. U.S.A.)를 處理한 M4N培地(Tamiya 등, 1953)에 *Chlorella ellipsoidea*를 一定量 接種하여 10Klux의 光線을 照射하고 CO<sub>2</sub> enriched air로 bubbling시키면서 25°C에서 5日間 培養하였다.

nalidixic acid가 이들 細胞 生長에 抑制效果를 나타내는 適正濃度を 定하기 위하여 nalidixic acid를 10, 15, 20, 30ppm으로 各各 處理한 培地에서 細胞를 5日間 培養하였다. 培養初와 培養中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 packed cell volume으로서 生長率을 追跡하여 Fig. 1에 表示하였다. 또한 吸光度(540nm, 660nm)를 測定하여 葉綠素의 含量 變化도 調査하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 10, 15ppm에서는 對照區와 比

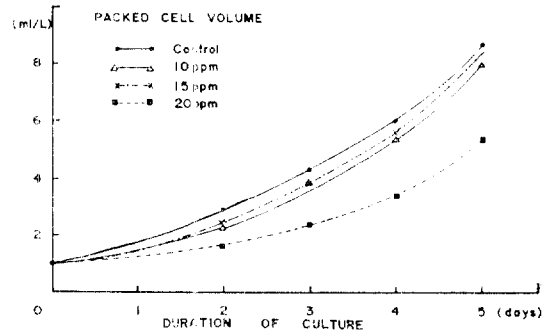


Fig. 1. Growth of *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (10ppm, 15ppm, 20ppm) during the culture.

較하여 별다른 變化를 볼 수 없었으며, 30ppm에서는 細胞의 致死現像이 나타났다. 그러나 20ppm에서는 對照區에 比하여 顯著한 抑制現像이 調査되었다.

그러므로 本 研究에서는 nalidixic acid의 抑制濃度を 20ppm으로 定하고 다음 實驗에 使用하였다.

### 2. 葉綠體의 分離

葉綠體의 分離는 Lyttleton(1962)의 方法을 變形하여 使用하였다. 收穫된 *Chlorella* 細胞를  $\frac{1}{500}$ M. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液과 蒸溜水로 各各 2~3回 洗滌하고 0.4M. NaCl이 包含된 0.5M. phosphate buffer(pH 7.5)에 3倍 程度の 石英砂를 添加한 뒤 glass homogenizer를 使用하여 4°C에서 破碎하였다. 破碎물을 cheese cloth에 濾過하여 whole cell과 細胞破壞物들을 除去한 後, 150×g에서 5分間 遠心分離하였다. 沈澱物들을 0.5M. phosphate buffer에 다시 懸탁하여 200×g에서 10分間 遠心分離하였다. 이와같이 하여 얻어진 上等液을 10,000×g에서 20分間 遠心分離한 後 沈澱物을 葉綠體로 使用하였다. 核物質의 汚染은 Feulgen 反應으로 確認하였다.

### 3. 核酸 分劃

接種後 培養初와 培養中間基에 一定量의 細胞를 收穫하여 培地를 除去한 後  $\frac{1}{500}$ M. K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液으로 2~3回 洗滌하였다. 洗滌한 細胞를 DNA는 Marmur(1961)方法, RNA는 Ishihama(1962)方法을 利用하여 分劃하였는데 그 處理順序는 다음과 같다.

#### 1) DNA抽出

- (1) 마쇄액(石英砂, 0.5M. phosphate buffer)에 細胞를 넣고 마쇄한 後
- (2) 마쇄물에 saline-EDTA (pH 8.0)와 25% sodium dodecyl sulphate를 處理하여 60°C에서 20分間 反應
- (3) 80% phenol과 蒸溜水로 5°C에서 15分間 혼든 뒤에 遠心分離
- (4) 얻어진 上等液에 ether와 ethanol를 添加하여 遠心分離
- (5) 沈澱物에 RNase와 saline-citrate (pH 7.0)를 處理하고 37°C에서 3時間 항온
- (6) 위 反應物에 phenol, ether, NaCl(最終濃度 3M.), ethanol를 添加한 뒤 遠心分離
- (7) 沈澱物을 3M. sodium acetate, saline-citrate, isopropanol로 溶解시킨 後
- (8) 沈澱된 DNA에 isopropanol을 2回 處理
- (9) 80%, 90%, 100% ether로 洗滌한 後 蒸發시켜 DNA를 抽出
- 2) RNA 抽出
- (1) 0.14M. NaCl, 0.1mM. MgCl<sub>2</sub>가 包含된 0.05M. acetate buffer로 2回 處理
- (2) 石英砂, polyvinyl sulphate, 0.5% sodium dodecyl sulphate, bentonite가 含有된 마쇄액에서 glass homogenizer로 30分間 마쇄
- (3) 마쇄액을 0.05M. acetate buffer(pH 6.2), 0.5% sodium dodecyl sulphate, polyvinyl sulphate, bentonite로 處理한 後
- (4) 沈澱物을 acetate buffer로 2回 遠心分離
- (5) 얻어진 上等液에 80% phenol 添加한 後 15分間 혼든다음 遠心分離
- (6) 沈澱物을 acetate buffer로 處理한 後 遠心分離
- (7) (5)와(6)에서 얻어진 上等液에 ether, ethanol를 添加하여 -20°C에서 20時間 放置한 後
- (8) 分離된 沈澱物을 0.1mM. MgCl<sub>2</sub>가 包含된 0.05M. acetate buffer(pH 6.2)로 溶解시킨 後 DNase를 處理하여 20°C에서 15分間 反應
- (9) 混合物에 2.5% bentonite를 添加하여 遠心分離
- (10) 上等液에 3M. NaCl, cold ethanol 添加하여 遠心分離
- (11) ethanol로 1回 洗滌 後 0.1mM. MgCl<sub>2</sub>,

polyvinyl sulphate가 包含된 0.05M. acetate buffer에 溶解시킨 다음 20時間 放置

(12) 生成된 沈澱物을 遠心分離하여 RNA를 抽出

3) 分析

分離된 DNA와 RNA는 Marshak과 Vogel(1951)의 方法에 따라 加水分解하였다.

즉 40°C~60°C에서 乾燥시켜 얻어진 白色의 結晶體를 72% perchloric acid로 100°C에서 1時間 加熱하였다. 冷却시킨 後 同量의 蒸溜水를 添加하여 遠心分離시켜 얻어진 上等液을 分離하였다. 이 上等液 속에 含有된 各 鹽基들의 吸光度를 測定하여 packed cell volume ml당 mg으로 鹽基含量을 換算하였다. 즉 packed cell volume ml에 대한 O.D. 값의 적용은 標準 鹽基 1mg을 1ml에 溶解시켜 各 鹽基別 吸收波長에서 測定한 값으로 나누어서 구하여진 數値가 鹽基組成 比較에 利用되었다.

加水分解시킨 sample속에 含有되어있는 各 鹽基의 含量의 最大 吸收波長을 決定하기 위하여 10mg의 adenine, cytosine, thymine, uracil을 0.2N PCA 0.2ml에 溶解시킨후, 蒸溜水를 添加하여 최종 5ml로 만든 溶液을 240nm에서 300nm까지 5nm 간격으로 吸光度를 測定하였다. 이때 各 鹽基의 吸光度의 最大 吸收值를 吸收波長으로 定하였다. Fig. 2는 各 鹽基別 吸收波長을 나타낸 것이다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 各 鹽基別 最大 吸收波長은 다음과 같다.

adenine: 265nm, guanine: 250nm, cytosine: 275nm, uracil: 260nm, thymine: 265nm.

위의 各 鹽基의 最大 吸收波長을 利用하여 sample內에 含有된 鹽基의 含量을 조사하였다.

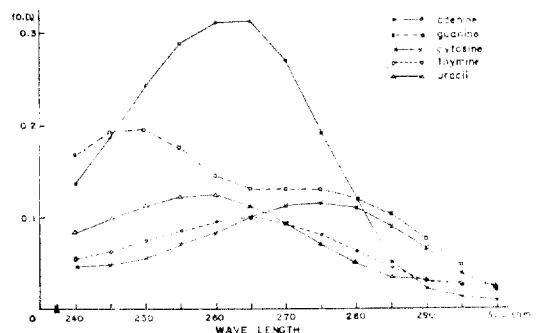


Fig. 2. Standard UV absorption curve on adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil.

### III. 結 果

#### 1. *Chlorella*細胞의 生長率

nalidixic acid를 處理한 M4N培地(Tamiya 등, 1953)에 *Chlorella*細胞를 5日間 培養하였다. 培養하는 동안 *Chlorella*細胞의 生長 및 葉綠素 含量에 미치는 影響을 對照區와 比較하여 Table 1과 Fig. 3에 表示하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Chlorella*細胞의 生長率은 對照區와 比較하여 處理區가 培養期間 顯著히 減少되었으며 葉綠素 含量 또한 540nm나 660nm에서 비슷한 傾向을 나타내면서 處理區에서의 抑制 效果를 보여 주었다.

#### 2. DNA의 鹽基含量 變化

*Chlorella* 細胞에서 DNA의 鹽基 含量에 미치는 nalidixic acid의 影響을 whole cell system과

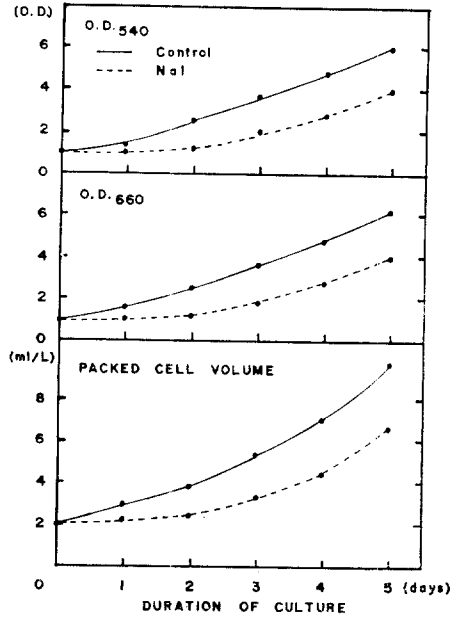


Fig. 3. Effect of nalidixic acid on the growth rate of *Chlorella* cells during the culture.

Table 1. Effect of nalidixic acid on the growth rate and chlorophyll contents of *Chlorella* cells which were cultured in the media treated with nalidixic acid (20ppm) for 5 days.

Days of culture	Packed cell volume(ml/L)		Optical Density			
			O.D. (540nm)		O.D. (660nm)	
	Control	Nal.	Control	Nal.	Control	Nal.
0	2.02	2.02	0.92	0.92	0.94	0.94
1	2.93	2.13	1.35	0.99	1.45	1.00
2	3.86	2.39	2.53	1.20	2.45	1.19
3	5.32	3.27	3.68	2.02	3.62	1.75
4	7.03	4.38	4.77	2.74	4.78	2.65
5	9.73	6.47	5.99	4.02	6.17	3.90

Nal.: nalidixic acid (20ppm)

Table 2. Amounts of base composition of DNA in *Chlorella* cells treated with nalidixic acid(20ppm) during the culture.

Days of culture	Control (mg/ml cell)					Nal. (mg/ml cell)				
	A	G	C	T	total	A	G	C	T	total
0	0.072	0.164	0.125	0.108	0.469	0.072	0.164	0.125	0.108	0.469
3	0.108	0.240	0.180	0.161	0.689	0.102	0.225	0.174	0.152	0.653
5	0.142	0.320	0.247	0.212	0.921	0.121	0.275	0.216	0.181	0.793

A : adenine, G : guanine, C : cytosine, T : thymine, Nal.; nalidixic acid (20ppm)

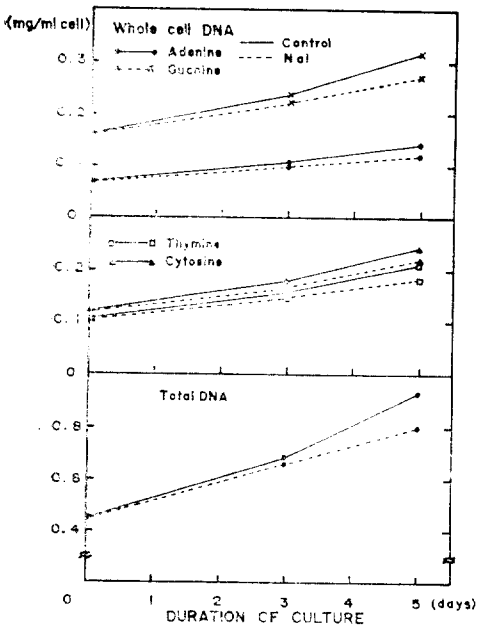
**Table 3.** Amounts of base composition of DNA in chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

Days of culture	Control (mg/ml cell)					Nal. (mg/ml cell)				
	A	G	C	T	total	A	G	C	T	total
0	0.007	0.008	0.007	0.011	0.033	0.007	0.008	0.007	0.011	0.033
3	0.011	0.015	0.013	0.017	0.056	0.009	0.013	0.010	0.014	0.046
5	0.019	0.027	0.024	0.028	0.098	0.016	0.023	0.021	0.023	0.083

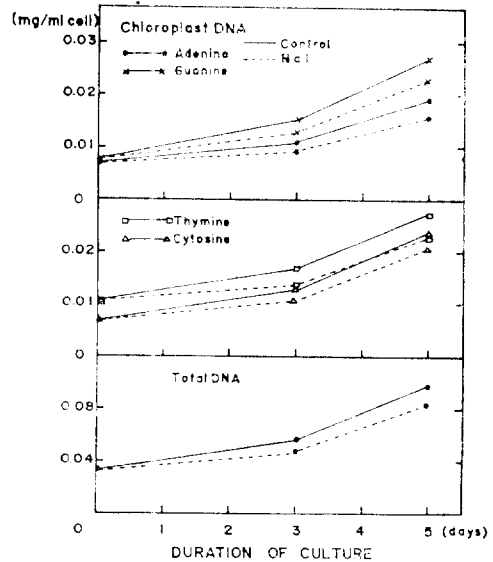
比較하여 그含量變化를 Table 2와 Fig. 4에, 分離한 葉綠體의 量的動態를 Table 3와 Fig. 5에 表示하였다.

nalidixic acid를 處理한 whole cell system과 分離한 葉綠體의 DNA 鹽基 含量은 對照區에 比하여 培養初期에는 약간의 減少 現象을 보여 주다가 培養末期에 顯著하게 抑制되었다. whole cell system의 處理區는 培養末期에 adenine 15%, guanine 14%, thymine 15%, cytosine 13%의 含量 減少로써 총 14%의 抑制效果를 나타내었고, 葉綠體의 境遇는 adenine 16%, guanine 15%, thymine 18%, cytosine 13%의 含量 減少로 全體적으로 15%가 抑制되었다.

purine기와 pyrimidine기의 抑制 現象은 Fig. 6에 表示하였다. whole cell system과 分離한 葉



**Fig. 4.** Changes in amounts of base composition of DNA in *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.



**Fig. 5.** Changes in amounts of base composition of DNA in chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

綠體의 處理區에서 purine기와 pyrimidine기는 비슷한 傾向의 抑制 現象으로써 whole cell system에서는 各各 14%, 葉綠體의 境遇는 各各 15%의 抑制效果가 調査되었다.

그러므로 nalidixic acid는 whole cell system의 DNA 合成을 阻害하는 것과 마찬가지로 葉綠體의 DNA 合成도 抑制하는 것을 確認할 수 있었다.

### 3. RNA의 鹽基調成 變化

nalidixic acid에 의한 whole cell system의 RNA 鹽基組成 變化는 Table 4와 Fig. 7에, 分離한 葉綠體의 RNA含量 變化는 Table 5와 Fig. 8에 表

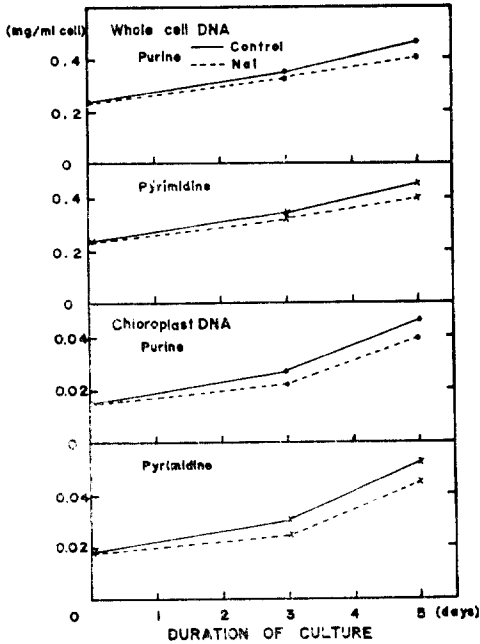


Fig. 6. Changes in amounts of purines and pyrimidines of DNA in whole cell system and chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

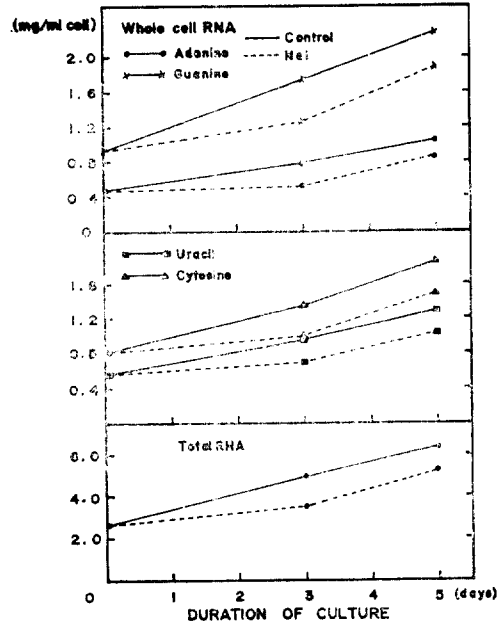


Fig. 7. Changes in amounts of base composition of RNA in *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

示하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 nalidixic acid가 처리된 whole cell system의 RNA 염기含量은 培養初期서 부터 顯著히 減少되었고, 培養末期에

다소 回復되기는 하였으나 對照區에 비하여 뚜렷한 抑制 現象을 보여 주었다. adenine 16%, guanine 15%, uracil 18%, cytosine 15%의 含量 減少로써 全體的으로 15%의 抑制 效果를 보

Table 4. Amounts of base composition of RNA in *Chlorella* cells treated with nalidixic acid(20ppm) during the culture.

Days of culture	Control (mg/ml cell)					Nal. (mg/ml cell)				
	A	G	C	U	total	A	G	C	U	total
0	0.460	0.869	0.802	0.556	2.687	0.460	0.869	0.802	0.556	2.687
3	0.785	1.751	1.368	0.972	4.876	0.566	1.266	0.982	0.700	3.514
5	1.058	2.294	1.858	1.300	6.510	0.830	1.878	1.510	1.040	5.258

Table 5. Amounts of base composition of RNA in chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

Days of culture	Control (mg/ml cell)					Nal. (mg/ml cell)				
	A	G	C	U	total	A	G	C	U	total
0	0.023	0.051	0.035	0.028	0.137	0.023	0.051	0.035	0.028	0.137
3	0.045	0.072	0.063	0.049	0.229	0.033	0.062	0.058	0.040	0.193
5	0.055	0.094	0.087	0.068	0.304	0.042	0.078	0.071	0.053	0.244

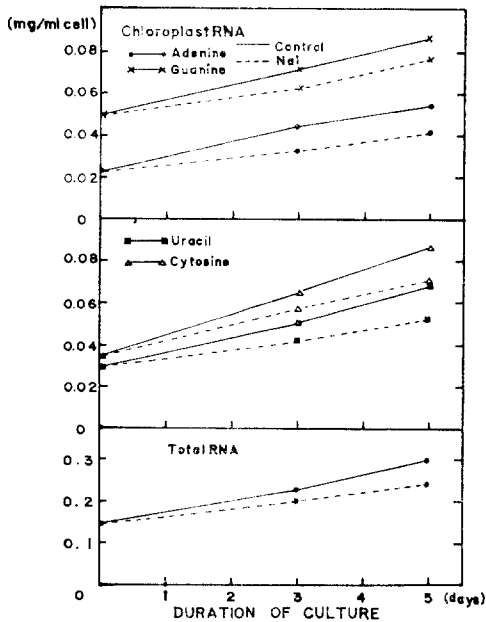


Fig. 8. Changes in amounts of base composition of RNA in chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

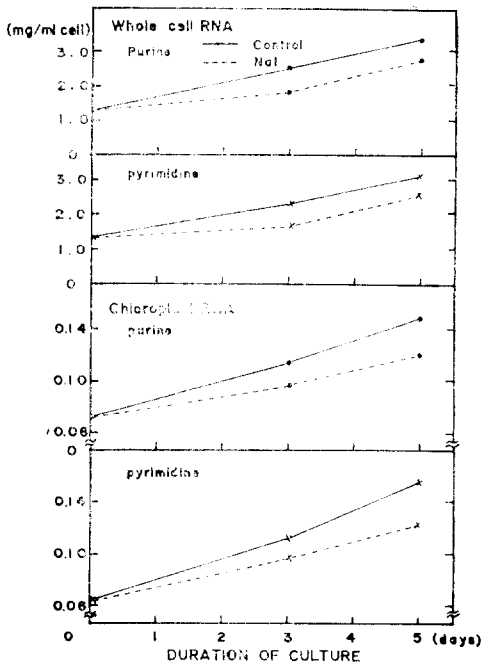


Fig. 9. Changes in amounts of purines and pyrimidines of RNA in whole cell system and chloroplast isolated from *Chlorella* cells treated with nalidixic acid (20ppm) during the culture.

여주었다.

Fig. 8의 葉綠體의 境遇에서도 對照區에 比하여 處理區가 顯著하게 抑制되었으며 adenine 25%, guanine 16%, uracil 23%, cytosine 18%의 含量 減少로써 總 20%의 抑制 效果가 나타났다.

purine기와 pyrimidine기에서의 nalidixic acid에 의한 量的動態는 Fig. 9에 表示하였다.

Fig. 9에서 보는 바와 같이 purine기와 pyrimidine기의 處理區는 對照區에 比하여 培養初期부터 顯著하게 抑制되었으며 培養末期에 whole cell system에서는 各各 19%, 葉綠體에서는 各各 20%의 沮害效果를 나타냈다.

위의 結果로 볼 때 RNA의 purine기와 pyrimidine기에 미치는 nalidixic acid의 影響은 DNA에 미치는 影響과 비슷하게 抑制 作用을 나타내었다. 또한 nalidixic acid에 의한 whole cell system에서의 RNA合成의 抑制 現象이 葉綠體에서도 일어난다는 것이 調査되었다.

#### IV. 考 察

Goss 등 (1965)은 nalidixic acid를 10ppm의 濃度로 處理하여 *E. coli*를 培養하는 동안에 細胞의 生長 抑制를 調査하였으며, *M. smegmatis*에서는 20ppm 以上の 濃度에서 DNA合成의 뚜렷한 抑制 效果가 일어났다. (Winder와 Barber, 1973) *Bacillus subtilis* 168-thy A, thy B 細胞들은 培養時 nalidixic acid 20ppm의 濃度를 處理한 後 3.5時間만에 20~30%의 DNA가 分解되어 減少 現象을 나타냈다고 報告되었다. (Ramareddy와 Reiter, 1969).

本 研究에서 *Chlorella*細胞를 nalidixic acid (20ppm)로 處理하여 培養한 結果 whole cell system 이나 分離된 葉綠體에서 細胞의 生長과 DNA 合成에 抑制 現象을 나타낸 것은 위의 報告와 一致된다.

이와같이 DNA合成의 抑制 現象은 二重螺旋型의 DNA가 풀어짐으로써 일어나거나(Ramareddy와 Reiter, 1969) nalidixic acid가 DNA의 複製를 抑制하였기 때문이다. (Geissler, 1967, Cowlishaw와 Ginoza, 1970) 또한 Crumplin과 Smith (1976)는 *E. coli* KL16에서 38S single-stranded

DNA fragments가 高分子量の DNA로 轉換하는 段階에서 nalidixic acid가 妨害하여 DNA合成을 阻害한다고 하였다. 최근 Sugino등(1977)과 Sanzey(1979)는 *E. coli* 細胞內에서 nalidixic acid가 DNA gyrase에 作用하여 DNA의 negative supercoiling과 cleavage를 妨害함으로써 複製와 轉寫가 抑制되어 DNA 合成率이 減少된다는 것을 밝혔다. Higgins등(1978)도 *E. coli* 細胞에서 nalidixic acid가 特定 nucleotide 序列에서 作用하는 DNA gyrase의 subunit A, B의 複合體에 의해 觸媒되는 supercoiling을 阻害함으로써 DNA 合成의 抑制效果가 나타났다는 것을 調査하였다.

이와같이 nalidixic acid에 의하여 DNA의 複製와 轉寫가 阻害됨으로써 일어나는 DNA合成의 抑制 現象은 本 實驗에서 調査된 DNA의 含量 減少의 結果와도 一致한다. 그러나 아직까지 *Chlorella*細胞에서는 DNA gyrase의 存在 與否가 밝혀지지 않았기 때문에 DNA合成의 抑制 效果가 gyrase의 活性이 妨害됨으로써 惹起되었는지는 아직 確認할 수가 없다.

Boyle등 (1969)은 *E. coli*細胞에서는 nalidixic acid 處理에 의해 DNA合成만이 抑制되고 RNA合成은 阻害되지 않는다고 하였으나 Crumplin과 Smith(1975)는 nalidixic acid가 박테리아의 DNA合成뿐 아니라 RNA와 蛋白質 合成까지도 抑制한다고 指摘하였다.

박테리아에서 20ppm의 nalidixic acid 濃度は DNA, RNA, 蛋白質 合成을 50% 程度까지 減少하며 (Winshell과 Rosenkranz, 1970) *Bacteriophage S13*은 20ppm의 濃度에서 DNA複製와 mRNA合成率이 20~25%로 減少한다는 것이 調査되었다. (Puga와 Tessman, 1973)

本 研究에서 20ppm의 nalidixic acid 濃度에 의해 *Chlorella*細胞의 DNA合成뿐 아니라 RNA合成이 20% 程度 抑制된 現象은 Winshell과 Rosenkranz(1970), Crumplin과 Smith(1975)의 結果들과 잘 附合된다.

Puga와 Tessman(1973)의 報告에 의하면 이와 같은 RNA合成의 抑制 現象은 *Bacteriophage S13*에서 nalidixic acid가 supercoiled plasmid DNA

에 作用하여 轉寫가 抑制되기 때문이라 하였으며, Smith등 (1978)은 DNA-RNA 交離實驗에서 nalidixic acid가 轉寫 水準에서 抑制 作用을 한다는 것을 밝혔다. 즉,  $\phi 80\text{ptrp}$  感染細胞에 nalidixic acid를 添加하면 phage promoter initiated mRNA가 分解됨으로써 mRNA 合成量이 10% 程度 減少한다는 것을 調査하였다.

또한 細胞內에서 核酸이 形成될 때 먼저 ribonucleotide가 合成되고 이들로 부터 deoxyribonucleotide가 만들어지며 뒤이어 DNA, RNA가 生成되는 데 本 研究에서 RNA 含量은 DNA의 合成이 阻害되었기 때문에 減少된 結果를 나타낸 것으로 위의 事實과 一致된다.

自律적으로 核酸이 合成되는 細胞內 小器官인 phage의 미토콘드리아에서 nalidixic acid는 DNA가 RNA로 轉寫하는 것을 抑制하여 RNA合成率을 減少시킨다고 報告된 바 있으며 (Zylber등, 1969, Attardi등, 1970) Michels등(1973)은 nalidixic acid가 核膜보다 特히 미토콘드리아膜을 잘 透過하여 nalidixic acid에 의한 미토콘드리아에서의 DNA 合成抑制가 核에서의 DNA 合成 抑制보다 다소 크다는 것을 指摘하였다.

그러나 本 研究의 *Chlorella* 細胞에서는 whole cell system과 分離한 葉綠體에서 nalidixic acid에 의한 DNA, RNA 合成의 抑制 效果가 20% 程度로 거의 同一한 것으로 調査되었는 데 이것은 原形質膜과 葉綠體를 透過하는 nalidixic acid의 程度가 거의 類似하기 때문에 일어난 結果로 思料된다.

이와같이 whole cell system과 마찬가지로 分離한 葉綠體에서도 核酸이 合成될 때 nalidixic acid에 의하여 抑制되는 것을 確認하였다.

특히 *Chlorella*細胞에서 nalidixic acid의 阻害 濃度は Ramareddy와 Reiter(1969), Winder와 Barber(1973)의 報告와 같이 細菌에서의 抑制 濃度인 20ppm으로 調査되었다.

그러나 nalidixic acid가 whole cell system이나 分離한 葉綠體에서 核酸이 形成될 때 어느 部位에서 作用하는 지 그 正確한 기작은 앞으로 더 研究해야할 課題라 생각한다.



## 摘 要

*Chlorella ellipsoidea*에서分離한葉綠體의核酸合成에 미치는 nalidixic acid의影響을糾明하기 위하여 nalidixic acid(20 ppm)를處理한培地에 *Chlorella*細胞를5日間培養하였다.

培養初와培養中間期에一定量의細胞를收穫하여 *Chlorella*細胞의生長率을測定하였으며, 이들細胞로부터分離된葉綠體에서核酸을抽出한後, 그含量을鹽基別로分析하여核酸合成에 미치는 nalidixic acid의效果를對照區의 그것과比較하여解析하였다.

1. nalidixic acid에 의한 *Chlorella*細胞의生長抑制濃度는 20ppm으로調査되었다.
2. whole cell system에서와 같이分離한葉綠體는 nalidixic acid에 의하여 DNA複製가阻害되어 DNA의含量이對照區에比하여顯著히抑制되었다.
3. 分離한葉綠體는 whole cell system에서와 같이 nalidixic acid에 의하여 RNA의轉寫가妨害되어 RNA의鹽基含量이減少되었다.

## 參 考 文 獻

- Attardi, G., Y. Aloni, B. Attardi, D. Ojala, L. Pica-Mattocchia, D. L. Roberson, B. Storrie, 1970. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 35, 599.
- Bauernfeind, A., and G. Grummer, 1965. Biochemical effects of nalidixic acid on *Escherichia coli*. Chemotherapy, 10, 95-102.
- Boyle, J. W., T. M. Cook, W. A. Goss, 1969. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. Vi. Cell free studies. J. Bacteriol., 97, 230-236.
- Chao, L., 1977. Nalidixic acid induced protein alterations in *Escherichia coli*. Anti. Agents and Chemo., 11(1), 167-170.
- Cowlishaw, J., and W. Ginoza, 1970. Induction of prophage by nalidixic acid. Virology, 41, 244-255.
- Crumplin, G. C., and J. T. Smith, 1975. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. Anti. Agents and Chemo., 8, 251-261.
- Crumplin, G. C., and J. T. Smith, 1976. Nalidixic acid and bacterial chromosome replication. Nature (London), 260, 643-645.
- Deitz, W., J. H. Bailey, E. J. Froelich, 1964. In vitro antibacterial properties of nalidixic acid a new drug active against gram-negative organisms. Anti. Agents and Chemo. 1963, 583-587.
- Ebringer, L., 1970. The action of nalidixic acid on *Euglena* plastids. J. Gen. Microbiol., 61, 141-144.
- Froelich, E. J., E. W. McChesney, G. Y. Leshner, A. V. R. Crain, D. Rosi, 1964. Absorption, excretion, and metabolism of a new antibacterial agent, nalidixic acid. Toxi. Appl. Pharm., 6, 292-309.
- Geissler, E., 1967. Untersuchungen über den mechanismus der induktion lysogener bakterien. XI. Der einfluss von DNA syntheses hemmern auf lysogene bakterien. Biol. Zentralbl., 86. (Suppl.) 55-67.
- Goss, W. A., W. H. Deitz, T. M. Cook, 1964. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 88, 1112-1118.
- Goss, W. A., W. H. Deitz, T. M. Cook, 1965. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. 11. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. ibid., 89, 1068-1074.
- Goss, W. A., W. H. Deitz, T. M. Cook, 1965. ibid, 89, 1008.
- Higgins, N. P., C. L. Peebles, A. Sugino, N. R. Cozzarelli. 1978. Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75 (4), 1773-1777.
- Ishihama, A., N. Mizuno, M. Takei., E. Otaka, S. Osawa, 1962. Molecular and metabolic properties of messenger RNA from normal and T<sub>2</sub>-infected *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 5, 251-264.
- Baird, J. P., G. J. Bourguignon, R. Sternglanz, 1972. Effect of nalidixic acid on the growth of deoxyribonucleic acid bacteriophages. J. Virology, 9(1), 17-21.
- Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, F. H. Bailey, R. P. Brundage, 1962. J. Med. Pharm. Chem., 5, 1063.
- Lishman, I. V., and J. Swinney 1963. Studies of a

- new antibacterial agent, nalidixic acid (Win 18, 320). *Brit. J. Urol.*, 25, 116-121.
- Lyman, H., 1967. Specific inhibition of chloroplast replication in *Euglena gracillis* by nalidixic acid. *J. Cell. Biol.*, 35, 726-733.
- Lyttleton, J. W., 1962. Isolation of ribosome from spinach chloroplast. *Exp. Cell. Res.*, 26, 312-317.
- Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218.
- Marshak, A., and H. J. Vogel, 1951. Microdetermination of purines and pyrimidines in biological materials. *J. Biol. Chem.*, 189, 597-605.
- Michels, C. A., J. Blamire, B. Goldfinger, J. Marmur, 1973. Studies on the action of nalidixic acid in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Anti. Agents and Chemo.*, 3(5), 562-567.
- Puga, A., and I. Tessman, 1973. Mechanism of transcription of *Bacteriophage S13*. II. Inhibition of phage specific transcription by nalidixic acid. *J. Mol. Biol.*, 75, 99-108.
- Ramareddy, G., and H. Reiter, 1969. Specific loss of newly replicated deoxyribonucleic acid in nalidixic acid treated *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.*, 100(2), 724-729.
- Sanzey, B., 1979. Modulation of gene expression by drugs affecting deoxyribonucleic acid gyrase. *ibid*, 138(1), 40-47.
- Smith, C. L., M. Kubo, F. Imamoto, 1978. Promotor specific inhibition of transcription by antibiotics which act on DNA gyrase. *Nature*, 275, 420-423.
- Sugino, A., C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, N. R. Cozzarelli, 1977. Mechanism of action of nalidixic acid; Purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74(11), 4767-4771.
- Tamiya, H., K. Shibata, T. Iwamura, T. Sasa, Y. Morimura, 1953. Effect of diurnally intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, 600, 76-81.
- Takeeto, A., and H. Watanabe, 1967. Effect of nalidixic acid on the growth of Bacterial viruses. *J. Biochem.*, 61(4), 520-522.
- Tribby, I. I. E., R. R. Friis, J. W. Moulder, 1973. Effect of chloramphenicol, rifampicin and nalidixic acid on *Chlamydia psittaci* growing in L cells. *The J. Infec. Diseases*, 127(2), 155-163.
- Winder, F. G., D. S. Barber, 1973. Effects of hydroxyurea, nalidixic acid and zinc limitation on DNA polymerase and ATP dependent deoxyribonuclease activities of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Gen. Microbiol.*, 76(1), 189-196.
- Winshell, E. B., and H. S. Rosenkranz, 1970. Nalidixic acid and the metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol.*, 104(3), 1168-1175.
- Zylber, E., C. Vesco, S. Penman, 1969. *J. Mol. Biol.* 44, 195.