

# 家蠶의 蟲體, 蛹體, 蠶卵 및 絹絲腺(後部)과 蜘蛛 紡績腺 RNA의 nucleotide 組成에 關한 研究

Studies on the RNA nucleotide composition of egg, worm body, pupa and silk-gland(posterior) of *Bombyx mori*, and spinning gland of spider.

金 榮 洙

東國大學校 農林大學

(1964年 4月20日受理)

## 緒 論

DNA의 base ratio  $G+C/A+T$ 는 生物 特히 細菌에 있어서 species specific하다는 事實은 이미 알려져 있는 事實이며, 이에 關하여 Lee et al<sup>(1)</sup> 및 Belozersky et al<sup>(2)</sup>의 廣範圍하게 調査한 論文이 發表되었다. DNA의 密度, 變性溫度의 測定과 같은 物理化學的 研究로 細菌의 base ratio에 있어 比較的 homogeneous한 것으로서,<sup>(34)(37)</sup> DNA의  $G+C/A+T$ 가 species specificity를 表現하는 것으로 보고 있다.<sup>(8)(4)</sup> 그러나 RNA에 있어서는 種類 即 機能과 分子의 크기에 있어 差異가 있고, 또 heterogeneous한 것이므로 RNA의 base ratio는 DNA의 base ratio와 같이 species specificity를 지니고 있는지는 疑問일 것이다. 그러나 DNA의 nucleotide code가 messenger RNA(m-RNA)에 print가 되며 이것에 依하여 아미노酸의 順列이 決定 되므로<sup>(5)(6)</sup> m-RNA가 細胞에서 純粹하게 充分한 量이 分離 될 수 있다면 이것의 base ratio를 살피 各生物間에 比較를 한다면 興味있는 結果를 얻을 것이다. 그러나 m-RNA는 細胞內的 RNA 全量의 1~2%에 不過하며 現在까지 좋은 分離法이 發見되지 못하였다. 따라서 base ratio를 살피는데 있어 total RNA 또는 超遠沈法으로 分離한 ribosomal RNA(r-RNA)와 soluble RNA(s-RNA)의 base ratio만으로서 比較하는 道理밖에 없다.

DNA의 base ratio와 같이 RNA의 nucleotide 組成을 살피 species specificity와의 關聯성을 調査한 論文이 여럿 發表 되었으며<sup>(7)-(13)</sup> 特히 Belozersky 등<sup>(14)</sup>에 依하여 微生物, 藻類, 高等植物 등의 nucleotide 成分을 廣範圍하게 調査 檢討된 바 있다. 即

Berozersky 등에 依하면 各種 細菌의 RNA의 nucleotide 組成은 DNA의  $G+T/A+C$ 와 같은 分類學的인 意義는 없고 remote species間에 若干의 差異는 認定하나 큰 變化는 보지 못하였다고 하며 역시 同氏들이 藻類와 高等植物 一部에서 RNA의 nucleotide 成分을 分析하여 細菌에서와 같이 그 nucleotide 組成이 서로 비슷하여 큰 差異는 發見치 못하였고 모두가 GC-type임을 報告하고 있다. 即 微生物, 藻類 및 高等植物 등에 있어 모두  $G+U/A+C$  ratio가 0.97~1.13 範圍內로서 1에 가까운 數值를 보였으며, 한편  $G+C/A+U$ 에 있어서는 1.03~1.45의 變域을 나타내고 있다.

그러나 昆蟲類에 對한 RNA의 nucleotide 組成을 報告한 論文으로서 單只 阿久根, 向井 등<sup>(15)</sup>이 後部 絹絲腺의 base ratio를 살핀 것 以外에는 볼 수가 없다. 著者は 이미 家蠶卵(有精卵 및 無精卵)의 發生過程에 따르는 RNA 含量의 變動 및 放射線 照射가 RNA 含量에 미치는 影響<sup>(15)</sup>에 對하여 報告한 바 있으며 이제 研究對象이 못되었던 昆蟲類에 對한 核酸의 base ratio 調査에 着手하여 爲先 家蠶에 關하여 RNA nucleotide 組成을 살피 본 것이다. 即 生物分類學上에 있어서 昆蟲類가 어떤 RNA nucleotide pattern을 갖었느냐를 調査하고 또 蠶卵에서 蟲體를 거쳐 蛹體에 이르기 까지 即 ontogenesis 乃至 metamorphosis가 RNA의 nucleotide 組成에 미치는 影響과, 한편 特殊蛋白質 絹絲蛋白質단을 合成하는 特殊腺組織인 絹絲腺의 RNA의 base ratio를 調査하는 한편 絹絲腺(後部) RNA를 超遠沈法으로 r-RNA와 s-RNA로 分離하여 그 base ratio의 差異를 살피고 또 蜘蛛가 거미줄을 産出하는 特殊腺인 紡績腺의 t-RNA를 抽出하여 이것의 base ratio를

分析하며 家蠶絹絲腺의 그것과 比較 檢討를 企圖한 것으로서 이에 關하여 興味 있는 結果를 얻어 여기에 發表하는 바이다.

## 2. 實驗材料 및 方法

### A. 材料

- a) 家蠶: 白頭×金剛(1963年秋蠶)
- b) 蜘蛛: 무당거미(Nephila clavata L, KOCH)  
(서울近郊採集)

### B. 方法

#### a) RNA의 分離

RNA의 分離方法은 Kirby의 phenol法<sup>(16)</sup>에 準한 Zubay法<sup>(17)</sup>에 따랐다. 即 試料 28gr에 冷 0.01 M-MgCl<sub>2</sub> 溶液과 0,001 M-tris buffer(p.H 7.4) 溶液 56ml를 加하고 冷凍條件에서 Teflon homogenizer 또는 乳鉢을 使用하여 試料의 2倍容量의 pyrex glass 粉末을 加하여 homogenize 한 後 同量의 88% phenol 溶液을 넣고 60分間 振盪한 다음 이것을 3,000 r.p.m에서 30分間 遠沈하여 上澄液을 suction 으로 分離하였다. 다시 이 上澄液에 同量의 88% phenol을 加하여 振盪한 後 18,000×g로 30分間 遠沈하여 水層部를 分離하였으며 여기에 0.1 vol.의 20% potassium acetate 溶液과 2 vol.의 無水알콜을 加하고 36時間 5°C에 放置하여 生成된 沈澱을 5,000×g로 5分間 遠沈하고 沈澱을 分離한 다음 冷 1M-NaCl 溶液 28ml를 加하고 1時間 激烈하게 振盪한 後 15,000×g에서 30分間 遠沈하여 上澄液을 分離하였다. 殘渣에 對해서 다시 冷 1M-NaCl 溶液 24ml로 洗滌하여 그 上澄液을 合한것에 2vol.의 無水알콜을 加하고 越夜 冷置한 다음 生成된 沈澱을 遠沈으로 分離하여 total RNA(t-RNA)의 試料로 하였다.

家蠶體는 5令 第5日의 蠶兒(60頭)를 冷凍下에 背位로 固定한 後 絹絲腺을 摘出하고 다시 未消化柔葉이 充滿한 消化管을 除去한 後 上記方法의 試料로 使用하였으며, 이때 同時에 分離된 絹絲腺에서 後部絹絲腺을 分離하여 試料로 하였다. 家蠶蛹體는 化蛹後 5~7日의 고치(繭)를 切開하여 雄性蛹體(30頭)만을 가려서 이것을 試料로 供하였다. 한편 蜘蛛(무당거미, Nephila clavata L. KOCH. 100頭)는 1963年 9月 서울 近郊에서 採集한 것을 冷凍條件에서 紡績腺을 摘出 分離하여 試料로 하였다.

#### b) 絹絲腺(後部)의 r-RNA와 s-RNA의 分離法

5令 第5日된 家蠶 30頭에서 絹絲腺을 冷凍條件下에서 摘出한 후 이 絹絲腺에서 後部絹絲腺을 分離

하고 이것을 超遠心沈澱法<sup>(12)</sup>에 따라 r-RNA와 s-RNA를 分離 하였다. 即 分離한 後部絹絲腺에 0.01 M MgCl<sub>2</sub> 加冷 0.001M tris buffer 溶液 20ml를 넣고 冷凍條件에서 homogenize 한 後 곧 700×g로 5~10分間 遠沈하여 細胞核 및 未粉碎 細胞破片등을 除去한 다음 다시 10,000×g로 10分間 冷凍 遠沈(Refrigerating International Centrifuge PR-2)하여 mitochondria를 分離 除去한 다음 上澄液에 對하여 Sphingo Model L(Rotor No.40)를 使用하여 105,000×g에서 90分間超遠心分離하여 上澄液과 沈澱을 各其 分離한 다음 上澄液과 沈澱에서 上記 phenol 方法으로 RNA를 分離하여 各各 s-RNA와 r-RNA를 調製한 것이다.

以上 各試料에서 抽出한 RNA 沈澱을 無水알콜로 脫水한 後 다시 ether로 處理하여 乾燥粉末을 만든 다음 이粉末 5~10mg을 5~10ml의 IN-KOH 溶液에 넣고 37°C에서 18~20時間 解置하여 mononucleotide로 加水分解한 後 濃 perchloric acid로 p.H 7.0으로 調整한 다음 5~6時間 冷置하였다가 沈澱된 KClO<sub>4</sub>를 遠沈으로 分離 除去한 後, 이것에 對하여 다음과 같이 ion exchange resin column chromatography 分離法의 試料로 삼았다.

#### e) 家蠶卵에서 RNA의 抽出法

蠶卵의 RNA 抽出은 現在까지 RNA 分離法으로서 가장 有力하게 알려진 phenol法<sup>(16)</sup>에 依해서 分離되지 못했으며 또 熱 10% NaCl 抽出法에 依해서도 成功 못하였다. 그러나 다음과 같이 lysozyme을 써서 비로서 蠶卵에서 RNA를 抽出하는데 成功하였다. 即 蠶卵約 10gr(約 2萬個)을 冷凍乳鉢에 넣고 冷凍條件에서 2倍量의 硬質硝子粉末과 冷 10% trichloroacetic acid 溶液 50ml를 加한 後 充分히 磨碎하고 이것을 Schneider法<sup>(18,20)</sup> 및 Schmit and Thannhauser法<sup>(21)</sup>에 依해서 脫脂粉末을 만들었다. 이 脫脂粉末 5gr을 tris buffer(p.H 7.4) 20ml에 懸濁시킨 後 lysozyme(Nutritional Co. 製) 100μg을 加하여 37°C에서 越夜 解置한 다음 이 溶液에 10%가 되도록 固體 NaCl을 넣고 80°C에서 30分間 加熱하여 核酸을 抽出하고, 遠沈으로 上澄液을 分離한 後 다시 10% NaCl 溶液 20ml로 2回反復해서 抽出한 다음 遠沈하여 上澄液을 모두 合하여 2.5倍量(v/v)의 95% 알콜을 넣고 數時間 冷置하여 沈澱된 核酸을 遠沈 分離 하였다. 이것에 IN-KOH 溶液 10ml를 加하고 37°C에서 18~20時間 解置한 後 이 溶液을 濃 perchloric acid로서 pH 4.0으로 調節하여 分離되는 DNA를 遠沈으로 除去한 다음

濃 KOH 溶液으로 pH 7.0 으로 마쳐 數時間 冷置한 後 沈澱된  $KClO_4$  를 遠沈으로 除去하여 이것을 column chromatography 의 試料에 供하였다.

d) Column chromatography 에 依한 RNA 의 nucleotide 組成 測定法<sup>(22) (23) (10)</sup>

i) Column 의 準備

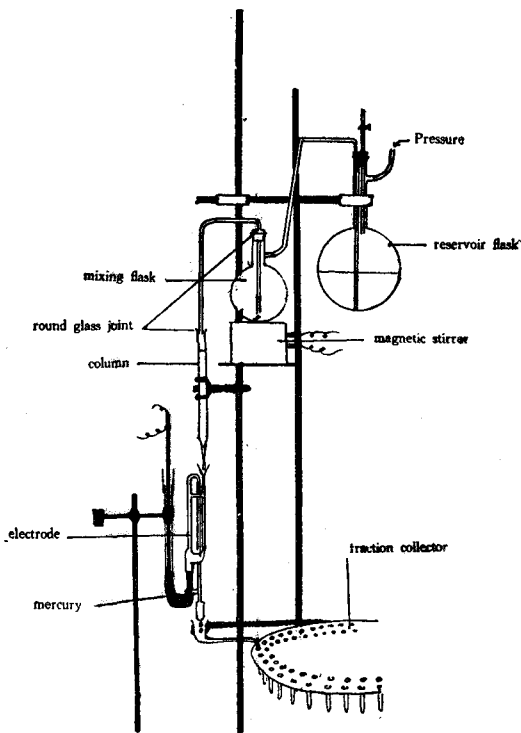
이온交換樹脂로는 Dowex 1×8(200~400mesh)을 使用하였으며 이 強鹽基性 이온交換樹脂를 다음과 같은 方法으로 活性化 시켰다. 即 먼저 再蒸溜水에 다 이온交換樹脂를 넣어 充分히 攪拌한다음 放置하였다가 水面에 浮遊한 粒子를 傾斜 除去한 後 이것을 適當한 column 에 充填시켜 5~10 倍量(v/v)의 6N-formic acid 와 IM-sodium formate 溶液의 等量混合液을 column 에 通過시킨 다음에 다시 5~6 倍量(v/v)의 88% formic acid 를 通過시키고 끝으로 再蒸溜水를 通過시켜 그 通過液이 中性에 이르기 까지 계속 洗滌하였다. 以上과 같이 活性化시킨 이온交換樹脂를 pyrex 製 column(0.7×26cm)에 弱한 壓力을 加하면서 注意하여 均質하게 充填시켰다. 이 column 에다 常壓에서 試料液을 徐徐히 加하여 nucleotide 成分을 樹脂에 吸着시킨 後 再蒸溜水로 3~5 回 洗滌하여 column 準備를 完了하였다.

b) Gradient elution 裝置

50ml 容의 mixing flask 와 500ml 容의 reservoir flask 를 다음과 같이 裝置하고 magnetic stirrer 를 mixing flask 밑에 固定시킨 다음 reservoir flask 에 適當한 量의 再蒸溜水를 넣고 硝子管을 通하여 물이 管과 mixing flask 에 充滿케 한 후 注意하여 逆 U 字 硝子管으로 mixing flask 와 column 을 連結시키되 이때 氣泡등이 남지 않게 하여 reservoir flask, mixing flask 및 column 이 完全히 물로 連結케 하였다. 特히 mixing flask 와 column 은 glass joint 로 하였다. reservoir flask 에 물이 거진 없어질때 1N-formic acid 30ml 을 加한 다음 magnetic stirrer 로 mixing flask 內液을 攪拌하면서 column 을 通過한 eluent 를 미리 連結하여 놓은 fraction collector(Reco 社製)로 3ml 式分取하였다. 이때 3ml 의 溶出速度는 弱한 壓力을 加하면서 15 分程度로 調節한 것이다. reservoir flask 의 溶媒(1N-formic acid)가 거이 없어질 무렵 다시 4N-formic acid 250ml 를 補充하여 gradient elution 을 繼續하였다. 1 回 實驗에 約 20~22 時間을 要하였으며 70~90 個의 fraction 을 分取함으로써 所期의 目的을 達하였다.

c) Optical density(O.D.)測定

以上과 같이 fraction collector 로 分取한 各 溶出



液의 fraction 을 silica cell 에 넣어 Beckman DU spectrophotometer 를 使用하여 波長 260 $\mu$  와 280  $\mu$  에서 O.D.를 測定하였다.

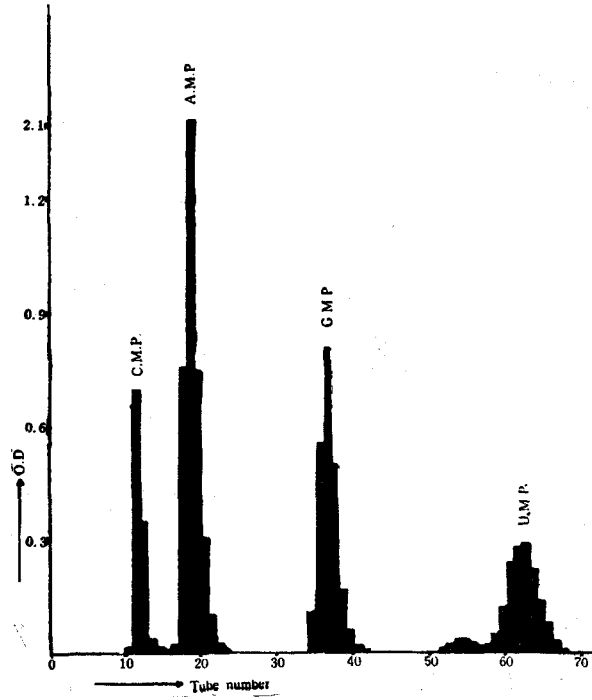
d) 다음 O.D.를 fraction number 에 對하여 plot 하여 O.D.의 peak 를 求하여 4 個의 nucleotide 의 peak 를 決定한 後 各 peak 에 對하여 波長 230  $\mu$  에서 300 $\mu$  까지 5 $\mu$  間隔으로 O.D.를 連續測定하여 이 O.D.曲線을 4 個의 純 nucleotide 의 標準曲線과 比較하여 nucleotide 의 peak 를 同定하였다.

e) 各 nucleotide 의 mole 濃度算出法

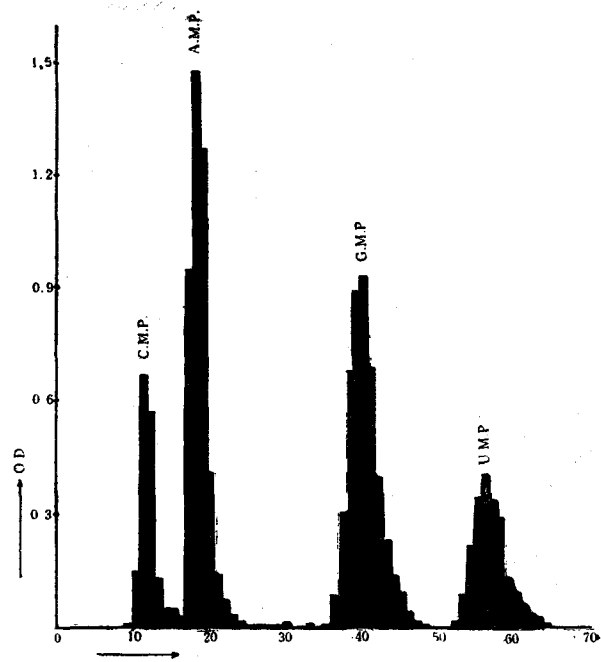
各 peak 의 O.D.合計에서 back ground 를 減한다음 各 nucleotide 의 extinction coefficient 로 除하여 各 nucleotide 의 mole 濃度를 算出하였으며, 이때 extinction coefficient 는  $E_{260}=6.8$ (citidylic acid),  $E_{260}=14.2$ (adenylic acid),  $E_{260}=11.8$ (guanylic acid),  $E_{260}=9.9$ (uridylic acid)<sup>(33)</sup>를 使用하였다. 한 試料에 對한 nucleotide ratio 는 同一한 試料에 對하여 4~5 回의 分析值를 平均하여 算出한 것이다.

### 3. 實驗結果 및 考察

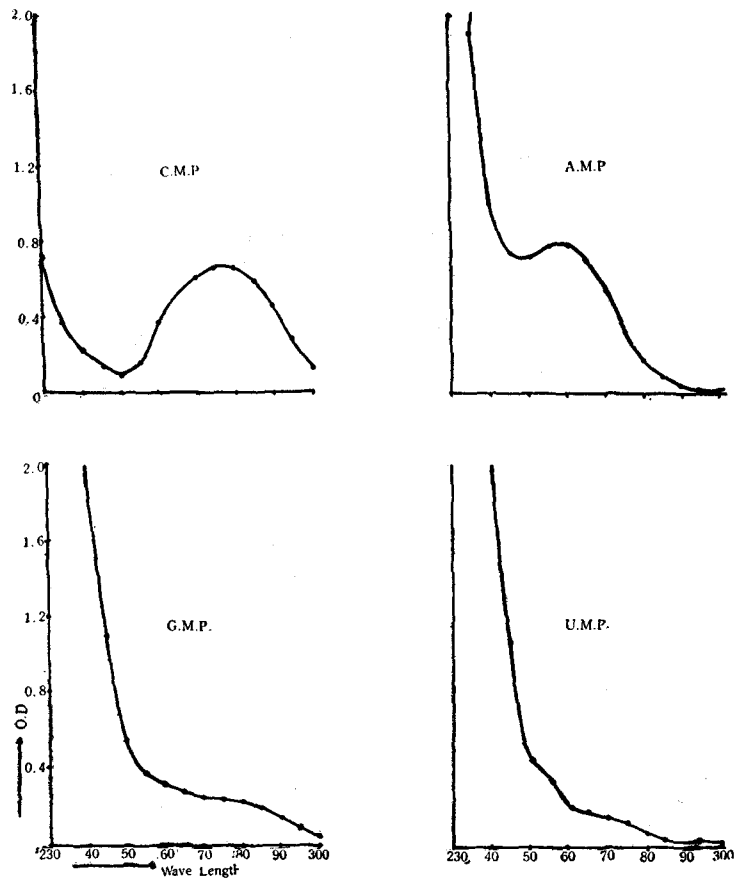
各 standard nucleotide 로서 sigma 會社製 AMP, GMP, CMP, UMP 各 2mg 式의 混合液과, yeast



第1圖 (1) C.M.P., AMP, GMP, UMP 混合液



第1圖 (2) yeast RNA



第2圖 (1) Yeast RNA의 各 peak의 波長 230~300  $m\mu$  連續 吸收曲線

RNA(Merck 製를 精製한 것인) 分解物에 對한 4個의 nucleotide의 分離相을 본 結果는 第1圖와 같다.

한편 各 peak의 nucleotide를 同定하는데 使用한

波長 230 $m\mu$ 에서 300 $m\mu$ 까지의 O.D.曲線은 第2圖와 같다.

家蠶의 虫卵, 虫體, 蛹體 및 絹絲腺(後部)의 nucleotide組成은 第1表와 같다.

第1表 家蠶卵, 蠶體, 蛹體 및 後部絹絲腺의 t-RNA의 nucleotide 組成(mole ratio)

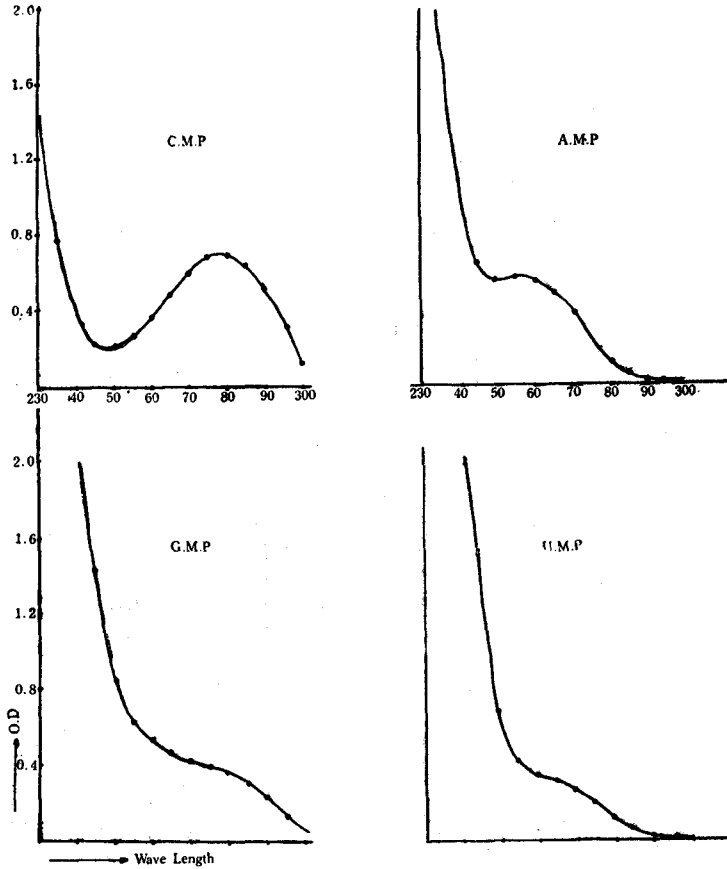
試料	C	A	G	U	$\frac{A}{U}$	$\frac{A}{C}$	$\frac{G+C}{A+U}$	$\frac{G+U}{A+C}$	$\frac{Pu}{Py}$
家蠶卵 RNA	11.7	10	14.1	12.8	0.82	1.21	1.14	1.24	0.99
蠶體 RNA	17.6	10	12.5	11.5	0.87	0.71	1.40	1.36	0.80
蛹體 RNA	10.4	10	17.3	9.8	1.02	1.66	1.40	1.33	1.35
後部絹絲腺 RNA	9.0	10	13.6	11.5	0.87	1.51	1.05	1.32	1.15

C: citidylic acid, A: adenylic acid, G: guanylic acid, U: uridylic acid, Pu: purine nucleotide, Py: pyrimidine nucleotide. adenylic acid=10.0

한편 이들 各試料의 fraction number에 對하여 O.D.를 plot한 것은 第3圖와 같다.

第1表에서 보는 바와 같이, 虫體와 蛹體의 Pu/

Py는 各各 0.80, 1.35로서 큰 差異를 보여준다,  $G+C/A+U$ 는 各各 1.40, 1.40으로서 同一하며,  $G+U/A+C$ 는 各各 1.36, 1.33으로 거의 一致함



第2圖 (2) 家蠶後部絹糸腺 RNA의 各 peak의 波長 230~300 mμ 連續 吸收曲線

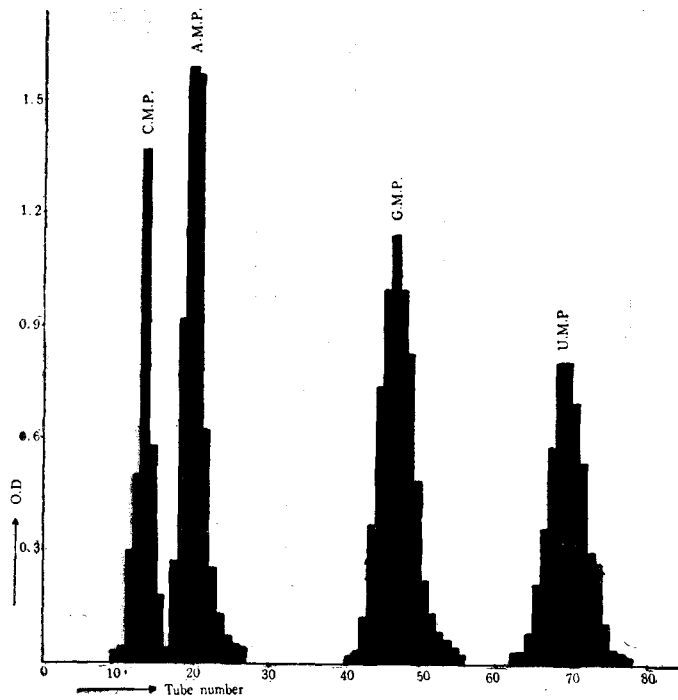
을 보았다 卽 이러한 nucleotide의 base ratio를 볼 때 蠶體와 蛹體사이에는 다시 말하면 metamorphosis에 의한 t-RNA의 nucleotide組成에 거이變化가 없음을 알 수 있다. 그러나 絹絲腺에 있어서는 Pu/Py가 1.15로서 虫體 또는 蛹體의 그것과 다르며, 또 G+C/A+U는 絹絲腺에 있어 1.05로서 蠶體 또는 蛹體의 1.40에 비하여 크게 다른것을 알 수 있다. 그러나 G+U/A+C는 1.32로서 虫體, 蛹體의 그것과 거이 同一하다. 또 蠶卵에 있어서는 Pu/Py, G+C/A+U 및 G+U/A+C가 각각 0.99, 1.14 및 1.24로서 虫體, 蛹體 및 絹絲腺에 비하여 顯著한 差異가 있음을 알 수가 있다.

一般으로 DNA는 그 base ratio가 各 生物의 species에 따라서 一定함은 이미 널리 알려져 있다.

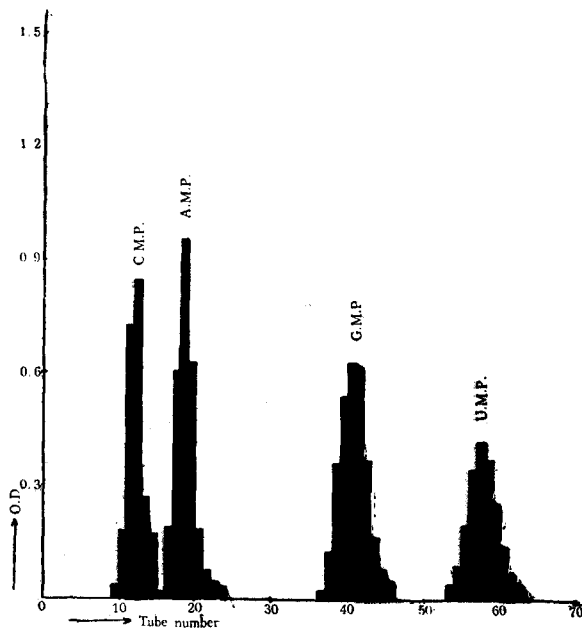
(1) (2) (3) (4) 그러나 nucleotide(base)ratio는 species에 따라 그 組成比에 따르는 變動이 別로 크지 못한은 細菌, 鳥類 및 高等植物 등 一部에서 밝혀진 바 있

다.<sup>(14)</sup> DNA의 密度 및 變性溫度의 測定등으로 base ratio에 있어 比較的 homogeneous한 것이고 DNA의 G+C/A+T는 species의 specificity가 있음을 理解할 수 있으나, RNA에는 몇가지 種類(s-RNA, m-RNA, r-RNA)가 있으며 各 RNA의 分子의 크기 및 機能등이 各各 다르므로 nucleotide組成에 있어 heterogeneous함을 짐작할 수가 있다. 따라서 t-RNA는 以上 서너 種類의 RNA를 포함한 것으로서 그 nucleotide ratio가 比較的 homogeneous한 DNA의 ratio와 같이 species specificity를 간직하지 못하리라는 것은 쉽게 想像할 수 있다. 이런 意味에 있어서 t-RNA보다는 어떤 一定한 RNA의 base ratio를 各生物에 對해서 比較하는 것이 妥當할 것이다.

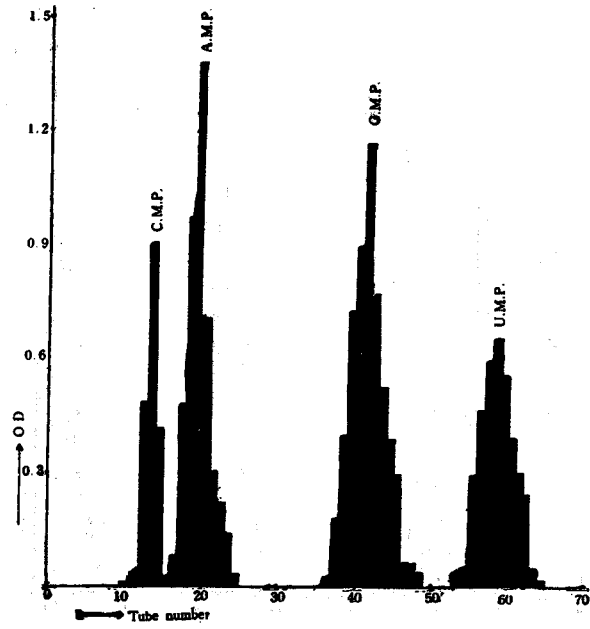
또한 DNA ratio(G+T/A+C)가 同一生物體에 있어서는 같은 것이나, RNA는 各組織에 따라서 base ratio의 變化의 有無를 살피는 것은 興味가 있을



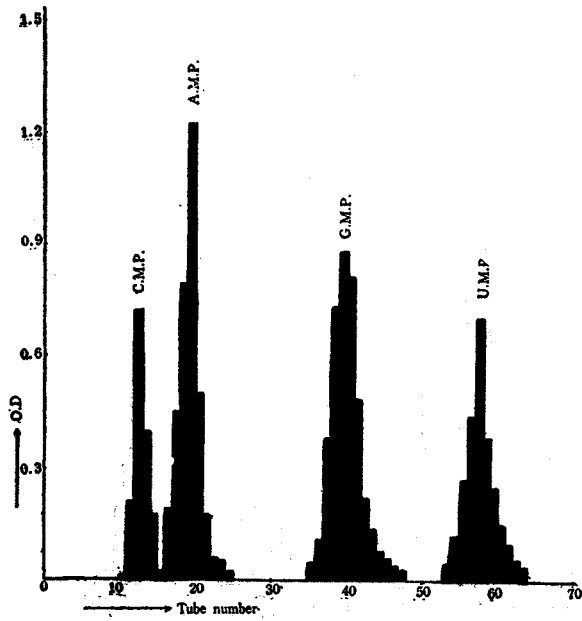
第3圖 (1) 家蠶卵(egg of Bombyx mori)의 t-RNA



第3圖 (2) 家蠶體 (worm body of Bombyx mori)의 t-RNA



第3圖 (3) 家蠶蛹體(pupa of Bombyx mori)의 t-RNA



第3圖 (4) 家蠶後部絹糸腺(posterior silk gland of Bombyx mori)의 t-RNA



것으로 생각이 된다.

本實驗에 있어서 蠶體, 蛹體 및 絹絲腺의 G+U/A+C는 1.3으로서 거의 同一한 것으로서 species의 specificity가 있음을 示唆하는 바이다. 特히 絹絲腺의 RNA는 絹絲 産出에 關與하는 것으로서 그 機能이 特殊함에도 不拘하고 G+U/A+C가 蠶體나 蛹體의 그것과 거의 同一하다는 것은 興味있는 事實이라 하겠다. 그러나 蠶卵에 있어서는 이미 蠶蟻가 거의 完成되어 있는데도 不拘하고 虫體의 base ratio와 顯著한 差異가 있음을 역시 興味있는

事實이라 볼 수 있다. 이것은 蠶卵의 embryo 以外의 卵內容物의 base ratio의 差異에 基因하는 것인지는 앞으로 追窮될 問題이다.

한편 文獻을 보면 各種 細菌(22種)의 RNA의 nucleotide 成分은 다음과 같으며, RNA의 Pu/Py가 1.18~1.36, G+U/A+C가 0.99~1.13, 또 G+C/A+U는 1.03~1.45이며, 또한 algae 및 高等植物에 關한 RNA의 組成<sup>(14)</sup>을 보면 다음과 같다.

即 algae(7種)는 Pu/Py가 1.11~1.24 이고,

RNA Composition in different bacteria<sup>(14)</sup>

SPECIES	Nucleotide content in molar per cent				Pu/Py	G+U/A+C	G+C/A+U
	G	A	C	U			
<i>Clostridium perfringens</i> .....	29.5	28.1	22.0	20.4	1.36	1.00	1.06
<i>Staphyl. pyogenes aureus</i> .....	28.7	26.9	22.4	22.0	1.25	1.03	1.05
<i>Pasteurella tularensis</i> .....	29.8	27.3	21.0	21.9	1.33	1.07	1.03
<i>Proteus vulgaris</i> .....	31.0	26.3	24.0	18.7	1.34	0.99	1.22
<i>Escherichia coli</i> .....	30.7	26.0	24.1	19.2	1.31	1.00	1.21
<i>Proteus morgani</i> .....	31.1	26.0	23.7	19.2	1.31	1.01	1.21
<i>Shigella dysenteriae</i> .....	30.4	25.9	24.4	19.9	1.29	0.99	1.21
<i>Salmonella typhosa</i> .....	30.8	26.1	24.0	19.1	1.32	1.00	1.21
<i>Salmonella typhi-murium</i> .....	31.0	26.1	23.8	19.1	1.33	1.00	1.21
<i>Ervinia carotovora</i> .....	29.5	26.5	23.7	20.3	1.27	0.99	1.14
<i>Corynebact. diphtheriae</i> .....	31.6	23.1	23.8	21.5	1.21	1.13	1.24
<i>Azotobacter agile</i> .....	31.0	24.2	26.0	18.7	1.23	0.99	1.33
<i>Azotobacter vinelandii</i> .....	30.3	23.9	25.5	20.2	1.19	1.02	1.27
<i>Azotobacter choococum</i> .....	30.4	24.7	24.7	20.1	1.18	1.02	1.23
<i>Aerobacter aerogenes</i> .....	30.3	26.0	24.1	19.6	1.29	1.00	1.19
<i>Mycobacterium vadosum</i> .....	31.7	23.8	23.5	21.0	1.25	1.12	1.23
<i>Brucella abortus</i> .....	30.2	25.4	24.9	19.5	1.26	0.99	1.23
<i>Alcaligenes faecalis</i> .....	30.9	25.7	24.1	19.3	1.31	1.01	1.22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31.6	25.1	23.8	19.5	1.31	1.05	1.24
<i>Mycobacter. tuberculosis BCG</i> .....	33.0	22.6	26.1	18.3	1.25	1.05	1.45
<i>Sarcina lutea</i> .....	32.7	23.2	24.2	19.9	1.27	1.11	1.32
<i>Actionomyces globisporus</i> .....							
<i>Streptomycini</i> .....	31.1	23.8	25.2	19.9	1.22	1.04	1.29

Abbreviations: G=guanylic acid; A=adenylic acid; C=cytidylic acid; U=uridylic acid; Pu=Purine nucleotides; Py=Pyrimidine nucleotides.

G+U/A+C가 0.99~1.09로서 大略 1에 가까우며, 또한 G+C/A+U는 1.09~1.3으로서 比較的 넓은 幅을 보여주고 있다. 또 高等植物(8種)의 一部에 있어 Pu/Py가 1.17~1.28 이고, G+C/A+U는 1.12~1.25이며, G+U/A+C는 0.97~1.04로 大略 1에 가까움다.

即 以上 文獻에 있어서 細菌, algae 및 高等植物의 G+U/A+C를 보면 極히 各生物의 一部分에

不過한 것이지만 0.97~1.13으로서, 本實驗 家蠶의 1.3에 比하면 相當한 差라고 볼 수가 있다. 家蠶의 虫體, 蛹體 및 絹絲腺의 G+U/A+C가 G+C/A+U보다 더 一定한 것을 보면 species의 RNA의 nucleotide 組成 比較에 있어서 G+U/A+C가 G+C/A+U보다 妥當하지 않을가 思料되는 바이며 이 事實은 아직 文獻에 指摘된 바 없다.

DNA에 있어 모두 Pu/Py와 G+T/A+C가 各

RNA Composition in algae and higher plants.<sup>(14)</sup>

ORGANISM	Contents of nucleotides in molar per cent				Pu Py	G+U A+C	G+C A+U
	G	A	C	U			
<b>Algae</b>							
Rhabdonema adriaticum.....	28.6	24.0	26.2	21.2	1.11	0.99	1.21
Chaetocerus decipiens.....	27.7	25.7	24.4	22.2	1.15	0.99	1.09
Thalossiosira nordenschedii .....	31.3	24.1	25.2	19.4	1.24	1.03	1.30
Hydrodictyon reticulatum .....	30.1	23.2	26.3	20.4	1.14	1.02	1.29
Ankistrodesmus sp. ....	30.5	22.8	25.1	21.6	1.14	1.09	1.25
Scenedesmus qaudricauda .....	30.1	23.6	26.0	20.3	1.16	1.02	1.28
Scenedesmus acuminatus .....	30.1	23.2	25.1	21.6	1.14	1.07	1.23
<b>Higher Plants</b>							
Equisetum sp. (spores).....	29.1	26.4	23.8	20.7	1.25	0.99	1.12
Triticum vulgare(germs) .....	29.6	24.5	25.8	20.1	1.18	0.99	1.24
Zea mays(germs) .....	29.2	24.7	25.6	20.5	1.17	0.99	1.21
Eucommia ulmoides(pollen) .....	29.0	24.9	24.9	21.2	1.17	1.01	1.17
Hamamelis japonica(seeds) .....	29.6	26.2	24.5	19.7	1.26	0.97	1.18
Brassica oleifera(seeds) .....	29.4	25.3	24.8	20.5	1.21	1.00	1.18
Phaseolus vulgaris(sprout) .....	31.4	24.9	24.1	19.6	1.26	1.04	1.25
Arachls hypogaea(sprout).....	30.9	25.3	24.6	19.2	1.28	1.01	1.25

Abbreviations: G=guanylic acid; A=adenylic acid; C=cytidylic acid; U=uridylic acid;  
Pu=purine nucleotides; Py.=pyrimidine nucleotides.

各 unit(1.0)가 되지만, RNA 에 있어서는 一般으로 Pu/Py 및 G+U/A+C가 相當한 差異가 있는 것으로 보면 RNA 의 構造가 DNA 와 다르고 그 組成이 heterogeneous 한 것을 알 수가 있다.

RNA 含量이 特히 많은<sup>(24)</sup>, 後部絹絲腺의 t-RNA, r-RNA, s-RNA 및 家蠶의 絹絲腺과 比較하기 위하여 蜘蛛紡績腺의 t-RNA 의 nucleotide 組成을 比較한 實驗結果는 第2表와 같다.

第2表 後部 絹絲腺의 t-RNA, r-RNA, s-RNA 및 蜘蛛紡績腺의 t-RNA 의 nucleotide 組成(mole ratio)

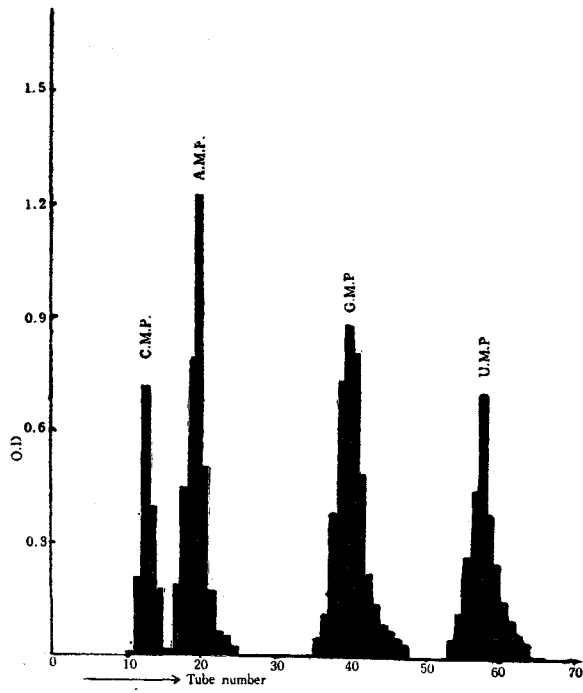
試 料	C	A	G	U	A U	G C	G+C A+U	G+U A+C	Pu. Py.
家蠶 後部 絹絲腺 의 t-RNA	9.0	10	13.6	11.5	0.87	1.51	1.05	1.32	1.15
" r-RNA	9.2	10	14.1	10.8	0.93	1.53	1.12	1.30	1.20
" s-RNA	12.9	10	19.6	11.0	0.91	1.52	1.55	1.33	0.65
蜘蛛 紡績 腺 의 t-RNA	11.8	10	16.3	10.8	1.09	1.38	1.35	1.24	1.16

C: citidylic acid, A: adenylic acid, G: guanylic acid, U: uridylic acid, Pu: purine nucleotide, Py: pyrimidine nucleotide, adenylic acid=10.0

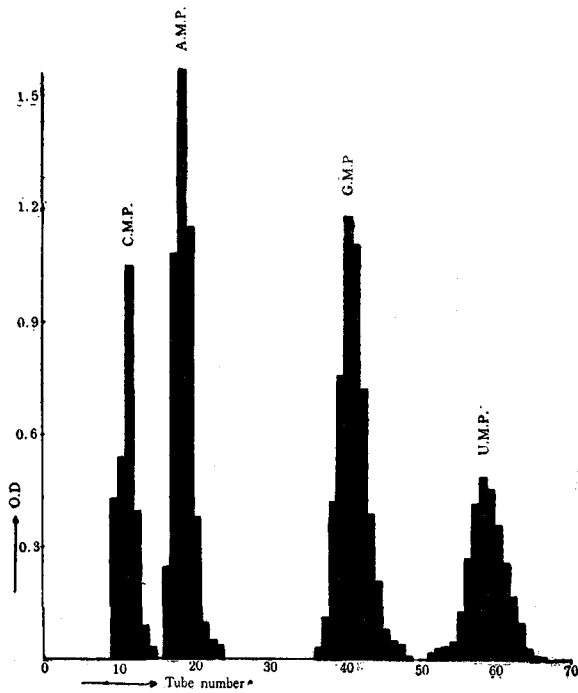
또 各試料의 fraction number 에 對하여 OD 를 plot 한 것은 第4圖와 같다.

即 絹絲腺의 t-RNA, r-RNA, 및 s-RNA 의 Pu/Py 를 보면 各各 1.15, 1.20, 및 0.65 로서 相當한 差異가 있음을 알 수 있다. 또한 t-RNA, r-RNA 및 s-RNA 의 G+C/A+U 를 보면 1.05, 1.12, 1.55 로서 역시 各 RNA 間에 큰 差異가 있음을 알 수 있다. 그러나 G+U/A+C는 以上 세 RNA 에 있어 1.3 으로서 實驗誤差內에서 거의 同一함을 알 수

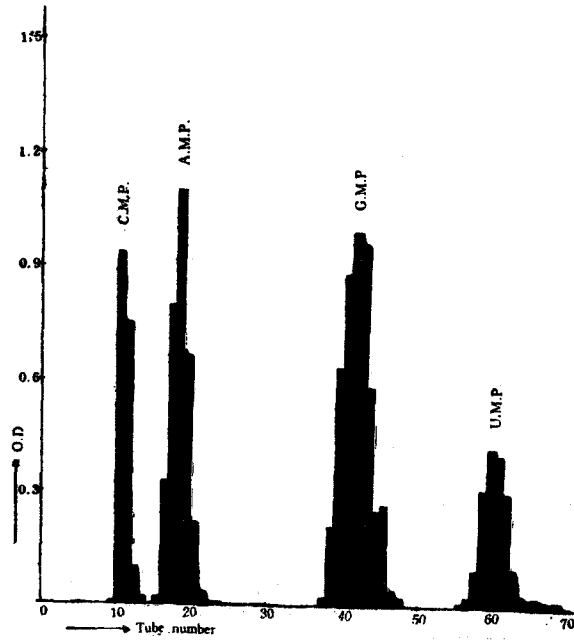
있다. 特히 絹絲腺의 s-RNA 는 그 機能이 活性化 아미노酸을 r-RNA 表面에 있는 m-RNA 로 運搬하는 것으로<sup>(30) (31) (32)</sup> 이것은 또한 各 아미노酸에 specific 한 것이다. 한편 絹絲의 아미노酸組成을 보면 glycine, alanine, serine, tyrosine 등이 全아미노酸의 90% 以上을 차지 하는 것으로서<sup>(25)</sup> 아미노酸에 specific 한 s-RNA nucleotide 組成에 差異가 있다면 各 s-RNA nucleotide 組成을 研究함에 있어서 絹絲腺이 좋은 材料가 될 수 있다.



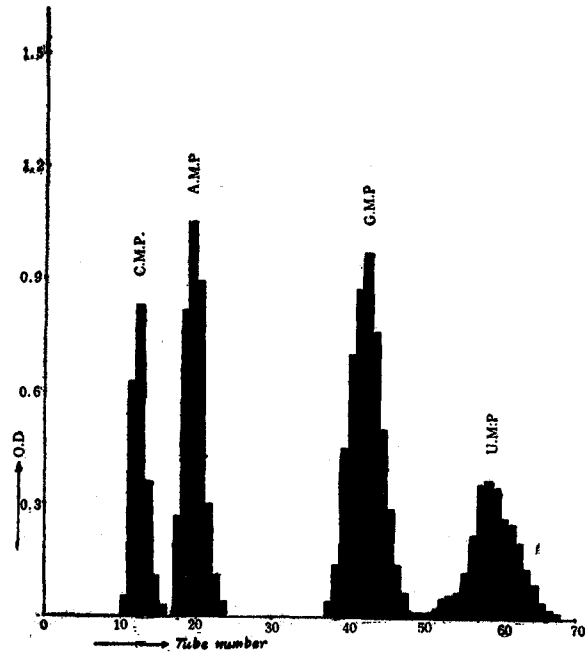
第 4 圖 (1) 家蠶後部 絹糸腺의 t-RNA



第 4 圖 (2) 家蠶後部 絹糸腺의 r-RNA



第 4 圖 (3) 家蠶後部 絹糸腺의 s-RNA



第 4 圖 (4) 무당거미 紡績腺의 t-RNA

r-RNA는 거의 同量的의 蛋白質과 結合되어 ribosome을 形成하며 이 ribosome 表面에 m-RNA가 附着이 되어 그 nucleotide code로서 s-RNA가 運搬해온 아미노酸을 一定한 順序로 配列시킴과 同時에 peptide 結合이 形成되어 蛋白質 一次構造인 polypeptide chain이 合成되는 것으로서 ribosome 表面이 蛋白質의 生合成 場所로서 알려져 있으나<sup>(6)</sup> r-RNA의 特殊한 機能은 아직 밝혀진 바 없다. 各種 材料에서 r-RNA와 s-RNA의 nucleotide 組成을 살핀 文獻은 많으며 그 兩者間에 base ratio의 差異를 指摘<sup>(12) (27) (28) (29)</sup>하고 있다.

本實驗에 있어서 역시 絹糸腺의 r-RNA 및 s-RNA의 nucleotide 組成에 差異를 보여주고 있다. 特히 Pu/Py에 있어 s-RNA는 r-RNA의 近 切半 밖에 안된다. 그러나 G+U/A+C는 r-RNA, s-RNA에 있어 各各 1.30, 1.33으로서 거의 同一한 것을 보면 亦是 興味있는 事實이라 하겠다. 萬一絹糸腺에서 m-RNA가 細菌에 있어서와 같이 methylated bovine albumin column chromatography 등으로 分離될 수 있다면 DNA code, 即 m-RNA의 nucleotide 및 그 配列 順序를 살피는데 絹糸腺은 역시 가장 좋은 材料가 될 수 있을 것이다. 本實驗에 있어서 m-RNA의 nucleotide 組成을 살피지 못한 것을 遺憾으로 생각하는 바이다.

한편 蜘蛛(무당거미)紡績腺의 t-RNA 組成을 보면 G+C/A+U 및 G+U/A+C가 各各 1.35, 1.24로서 가장 絹糸腺의 그것에 比하여 差異가 있으며, 紡績腺의 t-RNA의 Pu/Py는 1.16으로서 絹糸腺 t-RNA의 1.15와 거의 같다. 거미줄의 化學成分을 調査한 文獻은 아직 接하지 못하였으나 大略 蛋白質로 組成되며 아미노酸 組成에 있어 絹糸와 다를 것으로 생각 된다. 이런 意味에서 이 兩腺의 各 RNA의 nucleotide 組成을 살피는 것은 여러가지 意味로 興味있는 問題라 생각되는 바이다. 이 兩腺의 t-RNA의 base ratio 特히 G+U/A+C의 差異는 species에 依한 差異로 볼 수 있다. 또 蜘蛛紡績腺의 r-RNA, s-RNA nucleotide 組成을 살피지 못하여 絹糸腺과의 比較를 못한 것을 遺憾으로 생각하는 바이며 앞으로 繼續 追窮할 豫定이다.

家蠶에 對해서 RNA의 nucleotide 組成을 본 報告는 거의 차저볼 수 없으며 다만 阿久根, 白井등<sup>(13)</sup>이 後部絹糸腺에 對한 RNA의 鹽基組成을 본 報文이 있을 정도이며 이들의 分析値는 著者의 分析値와 비슷한 것이다. 그러나 蠶體, 蛹體 및 虫卵에 對한 nucleotide ratio를 밝힌 文獻은 아직 보지 못하였다.

RNA 測定에 있어서 蠶體, 蛹體, 絹糸腺(後部)에 있어서는 Kirby의 phenol法에 依하여 쉽게 抽出할 수 있었으나 蠶卵의 RNA는 卵殼의 堅固性 및 卵內 未完成 稚蠶의 表皮質등이 器械的 磨碎로 充分히 粉碎 안되므로 Kirby 其他 routine 方法으로 RNA를 抽出할 수 없었다. 그러나 mucopolysaccharide에 特殊의 作用하는 酵素인 lysozyme을 蠶卵의 脫脂粉末에 tris buffer(pH. 7.4) 溶液과 더불어 器械的으로 破碎한 卵殼 및 embryo 表皮質을 分解시킨 後 10% NaCl로서 加熱 抽出 함으로서 RNA 抽出에 成功하였다.

#### 4. 摘 要

家蠶(Bombyx mori)의 蠶體, 蛹體 및 絹糸腺(後部)에서 phenol法으로 RNA를 抽出하여 RNA의 nucleotide 組成(mole ratio)을 살피는 한편, 絹糸腺(後部)에서 超遠沈法으로 r-RNA, s-RNA를 分離하여 이에 對한 nucleotide 組成을 調査하고 또 家蠶絹糸腺과 比較할 目的으로 거미 紡績腺의 t-RNA를 分離하여 nucleotide 成分을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 蠶卵에 있어서 이것을 磨碎, 脫脂 後 lysozyme을 作用시키고 10% NaCl 溶液으로 加熱 抽出하는 새 方法을 考案하여 RNA의 抽出이 極難한 蠶卵에서 RNA를 分離하는데 成功하였다.

2) 家蠶卵, 蠶體, 蛹體 및 絹糸腺(後部)의 t-RNA nucleotide 組成은 다음과 같다.

試 料	$\frac{G+C}{A+U}$	$\frac{G+U}{A+C}$	$\frac{Pu}{Py}$
家 蠶 卵 的 RNA	1.14	1.24	0.99
家 蠶 體 的 RNA	1.40	1.36	0.80
蛹 體 的 RNA	1.40	1.33	1.35
後部絹糸腺의 RNA	1.05	1.32	1.15

이로서 蠶體, 蛹體 및 絹糸腺의 Pu/Py는 各各 差異가 있으나 G+U/A+C는 3者間에 1.3의 거의 同一한 數値를 보여주고 있다. G+C/A+U는 蠶體와 蛹體에 있어서 同一하나 絹糸腺의 그것과는 差異가 있다. 한편 蠶卵에 있어서는 Pu/Py, G+C/A+U, G+U/A+C가 各各 蠶體, 蛹體 및 絹糸腺에 있어서와 顯著한 差異를 보여주고 있다. G+U/A+C가 1.3이나 되는 RNA의 base ratio를 가진 生物에 關해서는 아직 報告된 바 없고 다만 本論文의 家蠶에 關한 RNA와 續編인 各種 貝類 RNA의 nucleotide 組成<sup>(26)</sup>에서 모두 1.3에 가까운 數値를 보여주고 있다.

3) 絹糸腺(後部) t-RNA 와 거미紡績腺의 t-RNA 의 nucleotide molar ratio 및 絹糸腺의 r-RNA, s-RNA A nucleotide 組成은 다음과 같다.

材 料	G+C A+U	G+U A+C	Pu Py
家蠶絹糸腺(後部)의 t-RNA	1.05	1.32	1.15
"      의 r-RNA	1.12	1.30	1.20
"      의 s-RNA	1.55	1.33	0.65
蜘蛛紡績腺의 t-RNA	1.35	1.24	1.16

即 家蠶絹糸腺(後部)과 거미紡績腺의 t-RNA nucleotide 組成은 Pu/Py 가 1.15 와 1.16 으로서 거이 同一하지만 G+C/A+U, G+U/A+C 에 差異가 있음을 보았다. 한편 家蠶絹糸腺(後部) r-RNA 와 s-RNA 의 Pu/Py 와 G+C/A+U 는 顯著한 差異가 있고, G+U/A+C 에 있어서는 1.3 으로서 거이 同一한 數値를 보여주고 있다.

4. 以上과 같이 蠶體에 關한 RNA 의 nucleotide 組成은 所謂 GC-type 로서, 現在까지 文獻에 報告된 各種 生物의 RNA 의 base ratio 에 關하여 比較檢討하였으며, RNA 의 nucleotide ratio 의 差異의 意義에 對하여 考察하였다.

끝으로 本研究을 遂行함에 있어서 始終懇曲한 指導와 鞭撻을 하여주신 서울大學校 醫科大學 教授 李基寧博士님께 深深한 感謝를 드리는 바이며, 또한 本研究을 위하여 積極指導하여주신 서울大學校 農科大學 恩師 金浩植學長님과 李春寧博士님께 感謝하오며, 實驗材料를 準備하여 주심과 아울러 여러가지로 敎示하여 주신 서울大學校 農科大學 教授 崔炳熙博士님께 또한 感謝드리오며, 實驗遂行에 있어 協力 하여주신 서울大學校 醫科大學 生化學 敎室 助教 全鎔元學士에게 謝意를 表하는 바이다.

### Abstract

The ribonucleic acid (RNA) was extracted from worm body, pupa and silk-gland (posterior) of Bombyx mori according to Kirby phenol method modified by Zubay. RNA of silk worm eggs was separated by 10% NaCl extracting method after treatment of lysozyme. The ultracentrifugal method was applied to separation of soluble RNA and ribosomal RNA from silk-gland. The nucleotide composition of RNA preparations as described above, was determined by ion exchange resin column chromatography. On the other hand, total RNA spinning gland of spider

(Nephila clavata L, KOCH) was prepared and its nucleotide composition was measured in an attempt to compare with that of silk-gland of Bombyx mori. Results of obtained are follows.

1) The RNA of silk worm eggs could not be separated by routine extraction method available, but was succeeded by lysozyme lysis. Its extraction process was described in detail in the text.

2) Nucleotide compositions of egg, worm body (excluded silk-gland), pupa and silk-gland of Bombyx mori, are summarized as follows.

Materials	G+C A+U	G+U A+C	Pu Py
Total RNA of eggs	1.14	1.24	0.99
Total RNA of worm body	1.40	1.36	0.80
Total RNA of pupa	1.40	1.33	1.35
Total RNA of silk-gland (posterior)	1.05	1.32	1.15

A: Adenylic acid, G: guanylic acid,  
C: citidylic acid, U: uridylic acid,  
Pu: purine nucleotide, Py: pyrimidine nucleotide.

Pu/Py ratio of RNA worm body, pupa, and silk-gland are different among each other, while their G+U/A+C ratio are almost identical within experimental error, ranging from 1.32 to 1.36. No such high figure of G+U/A+C value has been reported from biological materials. G+C/A+U ratio of worm body and pupa is identical and is different from that of silk-gland. Pu/Py, G+C/A+U, G+U/A+C ratios of silk worm eggs are considerably different from those of worm body, pupa and silk-gland, and discussion was made with respect to such differences.

3) The nucleotide compositions of total RNA, ribosomal RNA and soluble RNA, and total RNA of spinning gland of spider are summarized as below.

Materials	G+C A+U	G+U A+C	Pu Py
Total RNA of posterior silk gland of Bombyx mori	1.05	1.32	1.15
Ribosomal RNA of "	1.12	1.30	1.20
Soluble RNA of "	1.55	1.33	0.65
Total RNA of spinning gland of spider	1.35	1.24	1.16

G+C/A+U, G+U/A+C values of gland RNA of silk worm and spider are quite different each

other, while Pu/Py ratio of glands of both species is identical. The great difference was observed concerning Pu/Py and G+C/A+U values between soluble RNA and ribosomal RNA of silk-gland, but G+U/A+C ratio of RNA of two groups is identical.

4) It is remarkable fact that the RNA nucleotide composition of *Bombyx mori* changes during its ontogenetic process (from oval life to pupal one) with special difference to Pu/Py and G+C/A+U ratios. The RNA nucleotide pattern of *Bombyx mori* tissues belongs to GC-type with 1.3 of G+U/A+C ratio, which such high value has not yet been reported among microbial, algae and plant kingdoms.

### 參考文獻

- (1) K.Y. Lee, R. Wahl and E. Barbu; *Ann. inst. Pasteur*, **91** 212(1956)
- (2) A.S. Spirin, A.N. Belozersky, V. Shugaeva and U.F. Vanyushin; *Biokhimiya*, **22** 744(1957)
- (3) A.S. Spirin, A.G. Skavronskaya and A. Pretel-Martines; *Mikrobiologia*, **27** 273(1958)
- (4) N.S. Demyanovskaya and A.N. Belozersky; *Biokhimiya*, **19** 688(1954)
- (5) Crick, F.H.C.; *Symposia Soc. Exp. Biol.* **12** 138(1958)
- (6) J.N. Davidson; *The Biochemistry of the Nucleic acids*, p.240—241(1960) Wiley, Inc
- (7) Chargaff, E., Davidson, J.N.; *The Nucleic Acid*, **1** 397(1955)
- (8) Chargaff, E., Davidson, J.N.; *The Nucleic Acid*, **1** 401(1955)
- (9) Elson, D., Chargaff, E.; *Nature*, **173** 1037(1954)
- (10) H. Fukasawa.; *Exptl. Cell. Res.*, **25** 276—285(1961)
- (11) 三浦謙一郎; *生化學*, **33** 659(1961)
- (12) K.I. Miura; *Biochim. Biophys. Acta*, **55** 56—62(1962)
- (13) 阿久根, 向井, 日蠶, **31** 37—41(1962)
- (14) A.N. Belozersky et al; *Nucleoproteins*, p.199—228(1959)  
Interscience Publishers, Inc., New York.
- (15) 金榮洙, 李基寧, 崔炳熙; *韓國蠶絲*, **3** 23—28(1963)
- (16) K.S. Kirby; *Biochem. J.*, **66** 495—504(1957)
- (17) G. Zubay; *J. Mol. Biol.*, **4** 347—356(1962)
- (18) Schneider, W.C.; *J. Biol. Chem.*, **161** 263(1945)
- (19) Schneider, W.C. and Klug, H.L.; *Cancer. Res.*, **6** 691(1946)
- (20) Schneider, W.C.; *J. Biol. Chem.*, **164** 747(1946)
- (21) Schmidt, G. and Thannhauser, S.T.; *ibid.*, **161** 83(1945)
- (22) E. Otaka, Y. Hotta and S. Osawa; *Biochim. Biophys. Acta*, **35** 266(1959)
- (23) S. Osawa; *Biochim. Biophys. Acta*, **28** 271(1958)
- (24) Denucé, J.M.; *Biochim. Biophys. Acta*, **8** 11(1952)
- (25) Lucas, F., J.T.B. Shaw and S.G. Smith.; *J. Mol. Biol.* **2** 339(1960)
- (26) 金榮洙; *韓國農化*, **5** (1964)
- (27) E. Otaka, Y. Hotta and S. Osawa; *Biochem. Biophys. Acta*, **35** 267(1959)
- (28) K, Kimura, T. Kitamura and Y. Komade; *Biochim. Biophys. Acta*, **27** 420(1958)
- (29) F.F. Davis, A.F. Carlucci and I.F. Roubein.; *J. Biol. Chem.*, **243** 1525(1959)
- (30) Hoagland M.B., Stephenson, M.L., Scott, J. F., Hecht, L.I. and Zamecnik, P.C.; *J. Biol. Chem.*, **231** 241(1958)
- (31) Acs, G., Hartmann, G., Bowman, H.G. and Lipmann, F.; *Fed. Proc.* **18**(1) 178(1959)
- (32) Smith, K.C., Cordes, E. and Schweet, R.S.; *Biochem. Biophys. Acta*, **33** 286(1959)
- (33) W.E. Cohn; in *Methods in Enzymology*, Vol. **III**, p. 724(1957) Academic Press.
- (34) Doty, P. and Bunce, B.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** 5029(1952)
- (35) R. Rolfe and M. Meselson; *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **45** 1039(1959)
- (36) N. Sucoka, J. Marmur and P. Doty; *Nature*, **183** 1429(1959)
- (37) J. Marmur and P. Doty; *Nature*, **183** 1427(1959)