

蠶卵의 初期發育過程에 따르는 RNase活性 및 核酸量의 變動 및 그 X線照射에 의한 影響에 關한 研究

李 基 寧 · 全 鎔 元

(서울대학교 醫科大學)

(1972.7.15, 수리)

Variation of RNase activities and nucleic acid content of non-irradiated and irradiated eggs of *Bombyx mori* during early development of embryo

K.Y. Lee & H.W. Cheon

Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Seoul National University

(Received July 15, 1972)

Summary

Previously identified female pupae were X-irradiated with a dose of 1000r one day prior to moth transformation. Female moths from irradiated and non-irradiated pupae were copulated with normal male ones and allowed to lay eggs. Fertilized eggs were collected at 6 intervals such as 5, 15, 45, 90 minutes, 12 and 40 hours after laying, and deep-frozen immediately after each collection until measurements.

RNase activity and nucleic acid content were determined with each sample and following results were obtained.

1) It was proved to exist two RNases in silk worm eggs as in mammalian tissues, one active maximally at pH 5.8 and the other at pH 8.0, and the acid RNase activity was much higher than that of alkaline RNase.

2) The activity of acid and alkaline RNases increased remarkably during early development of the embryo of silk worm eggs, reaching the maximum activity at 45 minutes from laying time in non-irradiated group. There was no appreciable difference in two RNase activities for 45 minutes after laying in both control and irradiated groups, but the activity of acid and alkaline RNases in latter group was three times as much as that in former group, at 90 minutes from laying time and it was also found the acid RNase activity was 1.8 times higher than alkaline one in irradiated group.

3) The RNA-P content of control group increased considerably for initial 45 minutes, followed by a decline 45 minutes later with slight but steady increase thereafter. The RNA-P content of irradiated group, however, increased at initial 5 minutes, followed by a marked fall 90 minutes after laying, with no change thereafter. The DNA-P of control group showed a sharp increase for initial 45 minutes, followed by a decline 45 minutes later with no appreciable change thereafter, whereas that of irradiated group showed an increase at initial 15 minutes, followed by a sharp decline for following 45 minutes with a gradual increase thereafter.

It was thus proved that the synthesis of nucleic acid in silk worm eggs was much suppressed by X-irradiation during early development of embryo.

4) The RNase activity varied in parallel with the RNA-P content in control group, but the RNA-P content in irradiated group was shown to be minimum value in coincidence with the maximum activity of both RNases.

I. 序 言

일찍이 黑田, 李⁽¹⁾는 蠶卵水分량을 測定하여 卵內水分량이 蠶卵發育에 따라 顯著하게 變化함을 보았고, 赤尾⁽²⁾는 不越年性蠶卵에 있어서 還元糖, free 아미노態 N, 無機磷, Purine 體, Cholesterol, 磷脂質 등을 調査하여 第 4 日의 反轉期를 前後하여 顯著히 變動함을 報告하였다. 入戶野⁽³⁾는 催青卵內 RNA, DNA에 關하여 Feulgen反應과 Pyronine-methylgreen複色法에 의한 組織化學的 觀察을 한 바 있고 또 李⁽⁴⁾ 등은 家蠶卵 發育過程에 따르는 RNA 量의 變動 및 放射線이 蠶卵內 RNA 量에 미치는 影響을 觀察하여 RNA 量의 變動이 蠶卵의 胚子形成 및 發育과 密接한 關係가 있음을 밝혔고 또 放射線 照射로 卵內 RNA 合成이 크게 抑制됨을 보았다.

RNase는 RNA 또는 ribonucleoprotein의 細胞內 分解 또는 合成과 直接的인 關聯성이 있는 것으로 큰 興味를 끌고 있으며^(5,6,7) 또 RNA의 合成과 分解는 蛋白質合成과 密接한 關係가 있으므로^(8,9) RNase는 細胞分裂과 成長에 있어 重要的 Control 因子로서 큰 脚光을 받고 있다.

著者は 이제 家蠶有精卵의 RNase 活性을 調査하고 蠶卵의 初期發育 過程에 따르는 蠶卵內 RNase 活性 및 RNA, DNA 量의 變動과 미리 X-線照射를 한 蛹體(♀)에서 蛾化한 나비가 産卵한 有精卵에 對하여 産卵後 40時間 동안 RNase 活性과 核酸量의 變動을 아울러 觀察하여 發表 하는바이다.

II. 實驗材料 및 實驗方法

1. 實驗材料

蠶卵品種: 水原 101×102(交雜種)

採卵日字: 1971年 5月 10日~6月 18日

1971年 春蠶을 飼育(5月 10日 催青)하여 上簇 7 일째 고치를 採集한 다음 고치를 切開하여 蛹體를 꺼내 雌雄으로 鑑別한 다음 雌蛹에 대하여 一部는 無處理(對照群)로 하고 一部는 蛾化直前에 線量 1,000r의 X線을 照射하였다.

化蛾後 交尾시켜 産卵케 한 다음 對照蠶卵 및 照射蠶卵에 대하여 5分, 15分, 45分, 90分, 12時間 및 40時間 別로 採卵하여 試驗材料로 삼았다.

2. 實驗方法

RNA 및 DNA 定量法

核酸定量法은 Schneider⁽¹⁰⁾ 및 Schmidt-Thannhauser 法⁽¹¹⁾에 의하여 다음과 같이 施行하였다. 即 蠶卵 1g을 秤量하여 冷乳鉢에 넣고 冷條件下에서 2倍量의 硬質硝子粉末과 冷 10% TCA(Trichloroacetic acid)溶液 5ml를 加한 다음 充分히 磨碎하여 homogenate를 만들어 冷凍遠沈하였다. 上澄液을 除去한 다음 殘渣物을 冷 10% TCA 溶液으로 2回 洗滌遠沈하여 酸溶解物을 除去하고 다시 殘渣物을 70% ethanol로 1回, 95% ethanol로 2回 處理한後 無水 ethanol 및 ether로 乾燥시켜 얻은 脫脂粉末을 試料로 使用하였다.

이 試料에 對하여 100mg 當 1N NaOH 10ml를 加하고 37°C에서 20時間 靜置한 다음 氷醋酸(HAc)를 滴加하여 pH 4로 調整한 後 遠沈하여 그 上澄液을 RNA 定量用으로 使用하였다. 또 殘渣物에는 5% TCA 液 1.5ml를 加하여 90°C에서 10分間 抽出한 後 遠沈하여 그 上澄液을 DNA 定量用으로 삼았다. RNA-P, DNA-P 定量은 Fiske-Subbarow 法⁽¹²⁾에 의하여 定量하였다.

3. RNase 活性 測定法

蠶卵을 一定量 秤量하여 氷冷下에서 蒸溜水로 Teflon homogenizer를 使用하여 잘 磨碎한 後 International Model PR-2 冷凍遠心分離機로 500×g에서 10分間 遠沈하여 細胞核과 未破碎細胞 등을 除去한 다음 그 上澄液을 取하여 RNase 酵素 測定用 試料로 하였다. RNase 活性 測定은 Roth⁽¹³⁾ 法에 의하여 RNase 酵素源의 試料 1ml에 다 Chargaff⁽¹⁴⁾ 方法으로 精製한 RNA 1% 溶液 1.0ml를 基質로 加하되 alkaline RNase 活性 測定用으로는 pH 8 Veronal acetate buffer 1ml를 加하고 또 acid RNase 活性 測定用에는 pH 5.8의 Veronal acetate buffer 1ml를 加하여 37°C에서 30分間 靜置하였다. 다음에 acid-alcohol 溶液 3ml를 加하고 零度에서 數時

間 放置한 後 遠沈하여 上澄液을 Fiske-Subbarow⁽¹²⁾法으로 磷을 定量하여 RNase 活性을 測定하였다.

窒素는 micro-Kjeldahl法으로 測定하였다. RNase 活性은 試料 窒素 mg當 37°C에서 30分間 作用하여 分解된 RNA 即 酸可溶性 nucleotide의 P μ g數로 Unit를 삼았다.

4. 基質 RNA 精製法

市販 Merck會社製 RNA를 다음과 같은 方法⁽¹⁴⁾으로 精製하였다. 即 RNA 10g을 蒸溜水 150ml에 suspend시켜 濃암모니아水を 滴加하면서 溶解시켜 (pH 7.4) CHCl_3 -isoamyl alcohol(9:1) 混液을 40 ml 加하여 Sevag⁽¹⁵⁾法으로 除蛋白하였다. Sevag法에 依한 除蛋白操作을 4~5회 되풀이한 다음 最後의 遠心分離上澄液(3000 rpm, 10分)에 同量의 95% alcohol을 加하고 6N HCl을 攪拌하면서 適加하여 pH 2에서 沈澱物을 얻었다. 이 RNA 沈澱物을 2回 遠心洗滌한 後 注意하여 1N NaOH를 適加하면서 蒸溜水 200ml에 溶解(pH 7.4) 시킨다음 醋酸소다 結晶 2g을 加하여 溶解시키고 95% alcohol 400ml를 加하여 約 30分間 放置하여 RNA를 沈澱시켰다. 이 沈澱物을 다시 70% 및 95% alcohol로 各各 2回 洗滌한 後 吸引 乾燥시켜 精製 RNA를 얻었다. 以上 操作은 모두 低溫(5°C)에서 施行하였다.

III. 實驗結果

1. 蠶卵 RNase 活性의 pH에 따르는 變動을 보

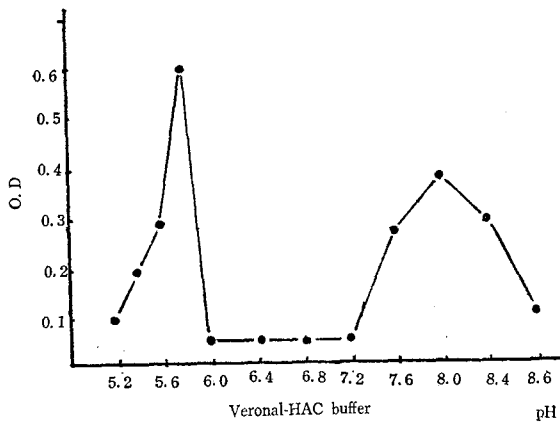


Fig. 1. Dependence of pH on RNase Activities of Silk Worm Eggs.

면 第1圖에서 보는바와 같이 蠶卵의 RNase 活性은 pH 5.8 및 pH 8에서 各各 peak를 보여 주어 蠶卵에도 動物組織에서와 같이 acid 및 alkaline RNase가 存在하여 있음을 알 수 있으며 또 alkaline RNase 活性이 acid RNase 活性보다 훨씬 낮다.

2. 照射蠶卵 및 對照(非照射)蠶卵의 採卵後 時間 經過에 따르는 RNase 活性의 變動을 보면 第1表, 第2圖에서 表示한바와 같이 產卵後 45分까지는 照射蠶卵 및 對照蠶卵 모두 다 같이 RNase 活性은 繼續 增加하고 있다.

Table 1. Variation of RNase Activities of Control and Irradiated Silk Worm Eggs during Early Development of Embryo.

hours	Control group		Irradiated group	
	Alkaline RNase*	Acid RNase*	Alkaline RNase*	Acid RNase*
5 minutes	171	198	120	168
15 minutes	327	261	234	321
45 minutes	420	501	450	478
90 minutes	180	288	513	942
12 hours	160	261	243	392
40 hours	120	240	237	280

* RNA-P μ g Split/mg N/30 mins denotes RNase activity

對照蠶卵에서는 產卵後 45분에 acid 및 alkaline RNase 活性이 最高值에 達하였다가 產卵後 90分에서는 減少되며 그 後는 產卵後 40時間까지 큰 變動은 없고 또 이때 acid RNase 活性이 alkaline RNase 活性보다 높은 值를 나타내고 있다. 한편 照射蠶卵에서는 acid 및 alkaline RNase 活性은 產卵後 90分에서 最高值에 達하고 이때 照射蠶卵에서는 acid RNase 活性이 對照蠶卵보다 3배나 높았으며 alkaline RNase 活性은 對照蠶卵보다 2.8배가 增加하였다. 또 照射蠶卵에서는 RNase 活性이 對照蠶卵의 그것보다 acid 및 alkaline RNase 活性이 모두 높은 值를 나타내고 있다.

3. 照射蠶卵 및 對照蠶卵의 產卵後 時間에 따르는 核酸量의 變化는 第2表, 第3圖에서 보는바와 같이 DNA 量은 對照蠶卵에서는 產卵後 45分에 最高值에 達하였다가 同 90分에 減少한 後 40時間의 觀察 期間동안 큰 變化는 없었으며 한편 照射蠶卵에서는 產卵後 45分에는 增加하였다가 同 90分까지 繼續 激減하고 그 後 부터는 漸次 增加하는 傾向을 보여 주고 있다. 또 RNA 量의 變化를 보면

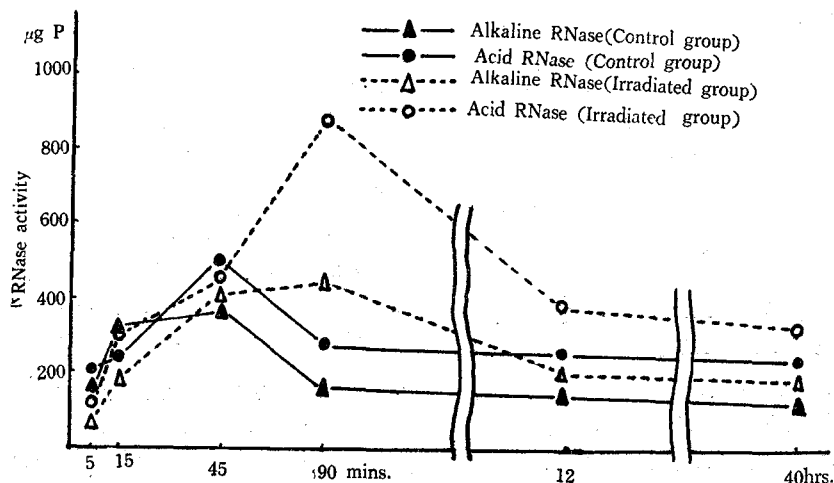


Fig. 2. Variation of RNase Activities of Control and Irradiated Silk Worm Eggs during Early Development of Embryo.

Table 2. Variation of RNA-P and DNA-P Content of Control and Irradiated Silk Worm Eggs during Early Development of Embryo.

	RNA-P ($\mu\text{g/g}$ defatted dry wt.)		DNA-P ($\mu\text{g/g}$ defatted dry wt.)	
	Control group	Irradiated group	Control group	Irradiated group
5 minutes	4,170	4,600	180	200
15 minutes	5,040	5,610	320	280
45 minutes	5,340	5,040	300	240
90 minutes	4,750	4,030	220	120
12 hours	5,260	4,170	220	170
40 hours	5,610	4,030	240	200

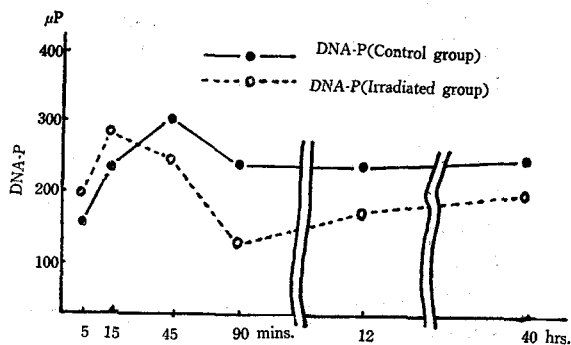


Fig. 3. Variation of DNA-P Content of Control and Irradiated Silk Worm Eggs during Early Development of Embryo.

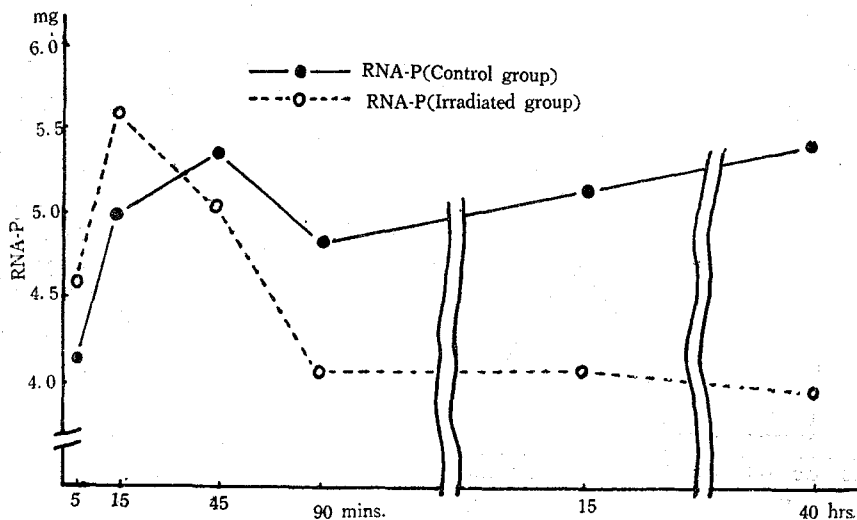


Fig. 4. Variation of RNA-P Content of Control and Irradiated Silk Worm Eggs during Early Development of Embryo.

第2表, 第4圖에서 보는 바와 같이 對照 蠶卵에서는 產卵後 激增하여 同 45분에 最高値에 達하였으며 同 90分에는 一旦 減少하였다가 同 40時間까지 繼續 增加하는 傾向을 보였으나 照射蠶卵에서는 產卵後 15분에 增加한後 同 90分까지 繼續 激減하였으며 其後는 40時間까지 別 變動이 없었다. 蠶卵內 RNA 量은 產卵後 90分에서 同 40時間동안 對照蠶卵과 照射蠶卵사이에는 큰 差異를 보여주고 있다.

IV. 考 察

阿久根等⁽¹⁶⁾에 의하면 5齡家蠶 後部絹絲腺에서는 pH 11까지 調査한 範圍內에서 至適 pH 5.3에서 作用하는 所謂 acid RNase만이 存在하고 있다하며 이 RNase는 牛脾臟 RNase와 비슷하다 하고 本酵素는 後絹絲腺에서 fibroin이 合成分泌가 始作되는 直前부터 또는 이것과 平行하여 活性化된다고 한다. 그러나 家蠶(受精)卵에서는 第1圖에서 보는 바와 같이 哺乳動物組織에서와 마찬가지로 pH 5.8과 pH 8에서 두개의 RNase 活性 peak 即 acid 및 alkaline RNase 活性이 存在하고 있음을 알 수 있고 또 alkaline RNase 活性보다 acid RNase 活性이 훨씬 높았다.

對照蠶卵과 X-線照射蠶卵에 있어 產卵後 時間 經過에 따르는 RNase 活性의 變化를 보면 對照蠶卵에서는 成熟分裂 및 減數分裂時期인 產卵後 5분과 15分에서 alkaline 및 acid RNase 活性이 모두 繼續 增加하였으며 受精時期인 45分에서 最高値를 나타내고 있다. 受精後인 產卵後 90分の 個體形成期에서는 RNase 活性은 減少되고 胚盤形成期인 產卵後 12時間과 胚盤成長期인 40時間에서도 個體形成期和 같이 낮은 値를 보여 주고 있다. 한편 X-線照射蠶卵에서는 正常蠶卵보다 늦게 即 產卵後 90分에 RNase 活性이 最高値에 到達하였으며 胚盤形成期에서도 RNase 活性은 低下되어 胚盤成長期까지 繼續 낮은 活性을 보여 주는 事實은 Chikushi⁽¹⁷⁾와 Takada⁽¹⁸⁾가 家蠶卵에 X-線을 照射하면 胚子發育이 늦어지고 掃蠶後 發育도 顯著하게 遲延된다고 報告한 것으로 보아 照射群은 對照群에 비하여 成熟分裂과 減數分裂 및 受精等이 늦어지는 것으로 推則된다. 또한 acid RNase 活性이 alkaline RNase 活性보다 큰것은 Roth⁽¹⁹⁾가 動物組織內에서는 alkaline RNase가 一種의 蛋白質인 inhibitor와 結合하여 不活性體를 形成하고 있다는 報告로보아 蠶卵의 alkaline RNase도 inhibitor와

結合되어 活性이 弱化되어 RNA 및 蛋白質合成을 control 하는 것으로 생각 할 수 있으나 이것은 蠶卵의 embryo가 放射線障害을 입는 結果로 lysosome 破壞에 起因되는 것으로 생각된다. 그러나 acid RNase 活性이 對照群에 있어서도 產卵後 45분까지 急増하는 것으로 보아 lysosome leakage만으로는 說明할 수 없다. 또 Umana⁽²⁰⁾는 alkaline RNase 活性이 蛋白質合成과는 逆比例한다고 報告한 것으로 보아 照射蠶卵이 對照蠶卵보다 RNase 活性이 높은 것은 蛋白質合成 또는 成熟이 低下되는 것으로 볼 수 있다.

Cherry⁽²¹⁾는 細胞가 成熟함에 따라 RNase 活性은 增加한다고 하였으며 X-線照射로 胚子の 成長과 發育이 抑制되므로 RNase 活性의 正常的인 增加가 遲延된다고 하였다.⁽²²⁾ 胚子の 形成과 分裂 및 增殖이 가장 旺盛한 產卵後 45分에 있어 alkaline, acid RNase 活性 및 DNA, RNA 量이 모두 增加하는 事實을 보면 蠶卵에 있어 RNase 機能을 RNA 分解만으로는 說明할 수 없다. 그러나 X-線照射群에 있어 產卵後 90分에 RNase 活性은 最高値에 達하고 있으나 RNA 量은 最低値를 보여 주고 있다.

有精卵에 있어 胚子の 分裂增殖이 產卵後 20分以內에 始作되며 細胞分裂이 旺盛할때 增加되는 것으로 보아 本實驗에서 蠶卵內 DNA 量이 產卵後 45分까지 激增하는 事實을 首肯할 수 있다. 또 DNA 量은 產卵後 90分에서 一旦 減少하였다가 다시 徐徐히 增加하는 傾向을 보여주고 있다. 그러나 X-線照射群에서는 產卵後 15分에서는 增加하였다가 同 45分, 90分에는 繼續 激減하고 그 後부터는 徐徐히 增加되는 傾向이다. 이와 같은 事實은 放射線으로 初期에 蠶卵胚子が 損傷을 입어 DNA 合成이 크게 抑制됨을 알 수 있으며(產卵後 90分에 특히 甚하다) 그러나 蠶卵에 있어 1,000r 程度の 弱한 線量으로는 胚子の 損傷이 徐徐히 回復되어 DNA 量이 漸次 增加되는 것으로 볼 수 있다.

蠶卵內 RNA 量도 DNA와 大體로 같은 傾向이다 即 正常蠶卵에서는 產卵後 45分까지 RNA 量은 激增하다가 90分에 若干 低下되었다가 다시 徐徐히 增加되는 傾向이다. 그러나 X-線照射蠶卵에서는 產卵後 15분에 增加한 RNA가 45分, 90分까지 繼續 急速히 低下된 다음 產卵後 40時間의 觀察期間동안 別變動이 없고 DNA 와는 달리 對照群의 RNA 量과 큰 差異를 보여 주고 있다. 李等⁽⁴⁾에 의하면 有精卵은 產卵後 RNA 量이 第2日부터 增加하

여 第5日에는 最高値에 到達하였으나 第6日부터는 漸減하는 傾向이었으며 한편 X-線照射有精卵에서는 RNA 量이 第2日까지 增加하였다가 其後에는 큰 變動없이 第5日까지 繼續되고 第6日과 第7日에서는 다시 若干 增加되는 傾向이라고 하였다.

V. 結 論

1. 蠶卵에서 高等動物組織과 마찬가지로 Optimum pH 5.8인 acid RNase 와 Optimum pH 8인 alkaline RNase의 두 RNase 活性을 보았으며 또 acid RNase 活性이 alkaline RNase보다 훨씬 높았다.

2. 蠶卵胚子の 初期分裂時 acid 및 alkaline RNase 活性은 모두 增加하여 對照蠶卵에서는 產卵後 45分에 peak를 形成하나 照射蠶卵에서는 產卵後 90分 即 對照群보다 45分 늦게 peak가 出現하였다.

產卵後 45分까지는 對照蠶卵과 照射蠶卵間에 acid 및 alkaline RNase 活性은 別差異가 없었으나 同 90分에서는 X-線照射蠶卵의 acid 및 alkaline RNase 活性은 對照卵의 그것보다 約 3倍에 達하고 또 照射蠶卵에 있어서 acid RNase 活性은 alkaline RNase 보다 1.8倍나 높았다.

3. RNA-P 量은 對照蠶卵에서는 產卵後 45分까지 繼續 크게 增加한 後 同 90分에 若干 減少하였다가 產卵後 40時間의 觀察期間 동안 漸增하는 傾向을 보여 주었다. 그러나 X-線照射蠶卵에서는 產卵後 15分에 增加하였다가 同 90分까지 急激히 減少된 後 同 40時間까지 큰 變化는 없었다.

DNA-P 量은 對照卵에서는 產卵後 45分까지 激增하였다가 同 90分에 一旦 減少된 後 40時間까지 큰 變動은 없었다. 그러나 照射蠶卵에서는 產卵後 15分에 DNA-P 量은 增加하였다가 同 90分까지는 크게 減少되고 그 後 부터는 다시 漸次增加하였다. 以上과 같이 蠶卵內 RNA, DNA 合成은 X-線照射로 胚子 初期分裂時에 相當히 抑制됨을 알 수 있다.

4. 對照蠶卵內 RNase 活性의 變動은 그 RNA-P의 變動과 거의 같았으나 照射蠶卵에서는 RNase 活性이 peak를 이루고 있을때 即 產卵後 45分과 90分時에 RNA-P 量은 最下値를 보여 주고 있다.

參 考 文 獻

1) 黑田嘉一郎, 李基寧: 植物及動物, 11, 17(19

37)

2) Akao, A., Keijo; J. Med., 3, 250 (1932)

3) Itano, Y.; J. Sericultural Sci. Jap., 20, 182 (1951)

4) 金榮洙, 李基寧, 崔炳熙; 韓國蠶絲會誌, 3, 23 (1963)

5) Schmidt, in Chargaff, E. and Davidson, J.N., The Nucleic Acids, Vol. I. Academic Press, Inc., New York, p.555 (1955)

6) Laskowski, M. in Sumner, J.B. and Myrback, K., The Enzymes, Academic Press, Inc., New York (1952)

7) Roth, J.S., Nature, 174, 129 (1954)

8) Brachet, J., Biochim. Biophys. Acta, 16, 611 (1955)

9) Brachet, J. in Chargaff, E. and Davidson, J.N., The Nucleic Acids, Vol II, Academic Press, Inc., New York, p.475 (1955).

10) Schneider, W.C., J.Biol. Chem., 164, 747(1946)

11) Schmidt, G. & Thannhauser, S.T., Ibid., 161, 83 (1945)

12) Fiske, C.H. & Subbarow, T., J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)

13) Roth, J.S., J. Biol. Chem., 208, 181 (1954)

14) Vischer, E. & Chargaff, E., Ibid., 176, 715 (1948)

15) Sevag, M.G., Biochem. J., 273, 419 (1934)

16) 阿久根了, 向井純一郎, 村山晃: 日本蠶絲學雜誌, 30, 73 (1961)

17) Chikushi, H.O., J. Sericultural Sci, Jap., 10, (1939)

18) Takada, K., Ibid., 28, 186 (1959)

19) Roth, J.S., J. Biol. Chem., 231, 1097 (1958)

20) Umana, R., Arch, Biochem, Biophys., 129, 767 (1969)

21) Cherry, J.H., Biochim. Biophys. Acta., 55, 487 (1962)

22) Cherr, J.H., Hageman, R.H. & Hanson, J.B., Radiat. Res., 17, 740 (1962).