

桑葉育蠶과 人工飼料育蠶의 消化液蛋白質의 比較研究

— 消化液 RFP를 中心으로 —

朴 熙 正 · 文 在 裕

서울대학교 農科大學

Comparative Studies of Digestive Fluid Protein of Silkworm, *Bombyx mori*, Larvae reared on Mulberry Leaves and Artificial Diets

Hee Jung Park and Jae Yu Moon

College of Agriculture, Seoul National University

SUMMARY

This study has been carried out to acquire some basic informations on the digestive fluid of Silkworm, *Bombyx mori* for developing artificial diets.

Silkworms reared on mulberry leaves and artificial diet, were used in this experiments.

The results obtained are as follows:

1. The Red Fluorescent protein was precipitated in 50% acetone solution and did not dissolved in n-butanol solution, but dissolved in methanol solution.
2. Electrophoretic analysis results of mulberry leaves rearing *B. mori* and artificial diet rearing *B. mori*, which has been treated with 50% acetone solution were as follows.
 - i) There was distinct difference at the position of high mobility
 - ii) Red Fluorescence was observed only at the position of first band of mulberry leaves rearing *B. mori*.
 - iii) No difference was shown in the electrophoretic patterns of mulberry leaves rearing *B. mori* on 5th instar 1st~3rd day, but some difference on 5th instar 4th, 5th day.
3. The RFP is the basic protein which has PI 8~9 according to the isoelectric electrophoresis.
4. The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showed that the molecular weight of RFP was 27,000.
5. The Sephadex G-75 chromatographic analysis showed that there was three peaks between number 16 and 28 in the mulberry leaves rearing *B. mori* chromatogram, but two peaks between number 18 and 31 in the artificial diet rearing *B. mori* chromatogram.

I. 緒 論

桑葉育蠶과 人工飼料育蠶의 消化液을 比較하면 可視
光線下에서 桑育蠶의 中腸은 靑綠色으로 보이는 前部

와 白綠色으로 보이는 後部로 나누어지고 紫外線下에
서는 靑綠色部分이 赤色螢光을 發하지만 人工飼料育蠶
은 中腸全體가 白黃色으로 紫外線下에서도 赤色螢光은
나타나지 않는다. 桑育蠶과 人工飼料育蠶의 消化液을
採取하여 觀察하던 人工飼料育區는 黃褐色으로 桑育區

는 綠褐色으로 보이고 紫外線下에서는 桑育區는 赤黃色으로 人工飼料育區는 黃色으로 觀察된다.

桑葉으로 飼育한 家蠶中腸消化液에는 各種消化酵素와 抗 Streptococcus 蛋白質, 赤色螢光蛋白質이 存在한다고 報告되어있다. 炭水化物分解酵素로 amylase와 maltase가, 蛋白質分解酵素로 pepsin과 性質이 비슷한 物質과 peptidase가 있고 脂肪分解酵素로 lipase와 esterase가 있으며 酸化酵素로 oxydase와 peroxidase가 存在한다. 또한, 內海進(1982) 등은 消化液內에는 抗 alkali性 細菌인 Streptococcus屬 細菌에 抗菌作用을 나타내는 일명 ASP(Anti-Streptococcus Protein)가 存在한다고 報告하였고 林屋 등은 抗 virus性 赤色螢光蛋白質의 存在를 報告하였다.

人工飼料로 飼育한 家蠶中腸消化液에도 桑育蠶과 마찬가지로 탄수화물, 蛋白質, 脂質分解酵素와 酸化酵素가 存在하지만 ASP의 存在를 人工飼料育蠶과 關聯해 報告된 것은 없고 다만 赤色螢光蛋白質은 人工飼料育蠶消化液內에는 存在하지 않는 것으로 報告되어 있다. 특히 赤色螢光蛋白質은 家蠶의 核多角體病 virus(NPV)에 對해 低抗性을 갖는다는 점에서 注目を 끌고 있다.

한편, chloroplast를 添加한 人工飼料로 3日間 飼育한 人工飼料育蠶의 中腸은 肉眼으로도 明確히 前部와 後部로 判別되고 紫外線下에서 赤色螢光을 나타내었다는 林屋 등(1971)의 報告에 의하면 赤色螢光을 나타내는 物質은 桑葉粉末이 添加되지 않은 人工飼料로 飼育한 家蠶消化液에는 存在하지 않으며 桑葉育蠶의 消化液에는 桑葉中の 成分에 의해 存在하는 것으로 생각되었다.

이 赤色螢光性物質은 鈴木(1936)에 의해 처음 報告되었고 鮎澤, 石塚(1968)은 virus 不活化力을 나타내는 蛋白質性物質일 것이라고 示唆하였다. 그뒤 林屋(1968) 등은 桑葉育蠶消化液에서 赤色螢光蛋白質을 分離하고 그 吸光 spectrum을 調査한 結果 280nm에서 강한 吸收帶가, 605nm에서 弱한 吸收帶가 있음을 報告하고 分離한 物質은 家蠶核多角體病 virus를 不活化시킨다고 報告하였다.

林屋 등(1971)은 免疫電氣泳動法과 amino acid labelling technique을 利用하여 赤色螢光蛋白質의 in vivo 合成場所를 調査한 結果 中腸細胞內에서 合成된다는 것을 밝혔으며 人工飼料育蠶消化液中에도 赤色螢光蛋白質과 恰似한 赤色螢光이 缺如한 蛋白質이 存在함을 보고하고 赤色螢光을 나타내는 蛋白質을 RFP(Red Fluorescent Protein)라고 했다.

西田 등(1974)은 in vitro에서 RFP의 生成過程을 研究했는데 그에 의하면 人工飼料育蠶 中腸磨碎液과 綠

葉 chloroplast를 37°C, pH10.4에서 2時間 反應시키면 赤色螢光蛋白質이 生成되며 綠葉中の chlorophyll a와 酵素蛋白質, 家蠶中腸由來蛋白質의 3成分이 關與함을 報告하였다. 이에 따라 人工飼料育蠶消化液에 存在하는 赤色螢光缺如蛋白質은 RFP의 chlomopore 部分이 結合되어 있지 않은 中腸蛋白質이라는 것이 確認되었고 그뒤 西田 등(1981)은 赤色螢光蛋白質의 生成反應은 二段階로 이루어지며 一段階는 chlorophyll a가 酵素蛋白質의 作用을 받아 chlorophyllide a로 되는 것이고 二段階는 chlorophyll a와 家蠶中腸蛋白質이 結合하여 chlorophyll a-中腸蛋白質複合體가 形成된 다음 光과 酸素가 關與하여 RFP로 變換한다고 報告하였다.

한편, 林屋 등(1976)은 明區와 暗區에서 各各 桑葉으로 飼育한 蠶에서 家蠶核多角體病 virus에 對한 抵抗力의 差가 있음을 確認하고 RFP의 生産의 有無가 그 原因이라고 報告하였다. 林屋 등(1978)은 RFP와 NPV를 毛細管重層法을 利用하여 接觸시키면 界面에 白色環이, 凝集板上에서 混合하면 白色沈澱이 생기는 것을 確認하고 똑 같은 實驗을 家蠶軟化病 virus(FV), tobacco mosaic virus(TMV), Autographa carifonia virus(Ac NPV)에 行하였으나 FV에서만 反應이 생기는 것을 觀察하였다. 그러나 最近(1984, 林屋 등) Ac NPV와도 沈澱反應이 생긴다고 報告되었다. 이들은 RFP와 家蠶 NPV의 沈澱反應을 電子顯微鏡으로 確認하고 이 反應이 哺乳動物의 抗原·抗體 反應과 類似한 點이 있으나 virus 不活化作用 機作은 差異가 있다는 것을 指摘하였다.

RFP의 分子量은 最近에(1984, 林屋 등) 超遠心分離와 SDS-電氣泳動 分析에 의해 27,000~28,000으로 報告되었고 純粹分離된 RFP는 SDS-PAGE에서 單一 band로 나타났고 超遠心에서도 亦是 單一 peak로 나타났으며 PAS reagent나 Sudan black에는 染色되지 않는 것으로 보아 單純·單鎖 蛋白質로 推定되었다.

本 研究에서는 家蠶人工飼料研究의 一環으로 RFP의 有無가 蠶의 耐病性과 關聯이 있다는 點을 重視하여 比較生理化學의 立場에서 桑育蠶과 人工飼料育蠶의 消化液內 蛋白質을 電氣泳動像으로 比較하고 SDS-電氣泳動法으로 分子量을 測定하였으며 Sephadex G-75 Permeation Column Chromatography를 行하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

本 實驗에는 桑葉育蠶, 人工飼料育蠶을 供試했다.

2. 供試材料의 飼育

桑育蠶은 서울農大蠶室에서 桑葉으로 飼育하였으며 人工飼料育蠶은 동방유량에서 購入한 人工飼料를 利用하여 全齡 殺菌消毒한 飼育相에서 飼育하였다.

3. 消化液 採取

桑育蠶은 5齡 1, 2, 3, 4, 5日 經過時 各 200頭씩 (30時間 絶食後) 電氣衝擊法으로 採取하였으며 人工飼料育蠶은 5齡 3日 經過時 各 200頭씩 電氣衝擊法으로 採取하고 900×g에서 20分 冷凍遠心하여 桑葉粉末을 除去하고 -20°C 冷凍庫에 保管했다.

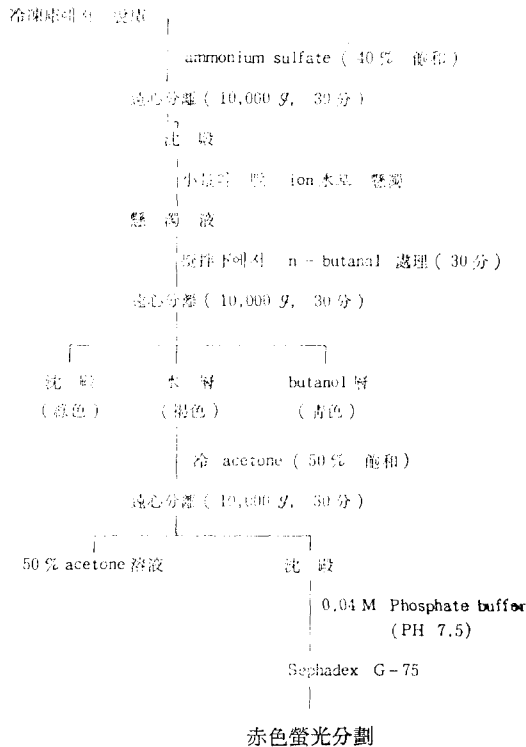
4. 紫外線下에서 消化液의 赤色螢光의 觀察

各區 消化液原液을 紫外線下에서 觀察하고 桑育區에 acetone, *n*-butanol, methanol을 各々 처리하여 一定時間이 經過한 後 紫外線照射機로 254nm에서 赤色螢光의 有無를 관찰하였다.

5. 消化液의 RFP分劃의 分離

既報의 (林屋 등, 1968) 方法에 따라 Table 1과 같이 分離하였다. 以下の 實驗은 5°C 以下에서 遂行하였다.

Table I. Treatment of digestive fluid protein with ammonium sulfate, *n*-butanol, cold acetone.



6. PAGE 電氣泳動에 依한 消化液蛋白質의 比較

Laemli(1964) 方法에 따라 7.5%와 10% gel 濃度에서 消化液原液의 電氣泳動像을 比較하고 50% acetone 沈澱分劃의 電氣泳動像을 比較하였다. 消化液原液의

試料處理는 Tris buffer 0.043ml와 各區 消化液原液 0.255ml를 섞고 50% glycerol이 含有된 0.05% bromophenol blue 20 μ l를 加한 다음 18×15×0.2cm 크기의 slab gel을 作成하여 各 slot當 90 μ l의 試料를 loading 시켰다.

50% acetone 沈澱分劃의 試料處理는 試料 100 μ l와 Tris buffer(pH6.8) 25 μ l을 섞고 glycerol이 含有된 B.P.B. 5 μ l을 加하여 泳動用試料를 만들었다. 電氣泳動은 30mA의 定電流에서 3時間 行하였다. 泳動槽로부터 分離한 gel은 染色하기前에 紫外線下에서 RFP의 泳動像을 觀察하고 methanal, acetate, 蒸溜水(5:1:5) 混合液에 녹인 0.25%(w/v) Coomassie Brilliant Blue 溶液으로 室溫에서 5時間 染色한 後 7% Trichloroacetic acid로 脫色시켰다.

7. 等電點電氣泳動에 依한 RFP의 PI測定

Svensson과 Vesterberg의 方法에 따라 2% ampholine을 함유하는 polyacrylamide column gel을 만들고 蛋白質試料溶液에는 2% ampholine과 30% glycerol를 첨가했다. 泳動은 200V에서 10時間, 400V에서 1時間 行한 後 gel을 column에서 뽑아내고 紫外線下에서 赤色螢光의 위치를 확인한 다음 그 部分의 pH를 glass electrode를 利用하여 測定했다. 15% TCA 溶液으로 gel內 蛋白質을 固定한 後 8% acetic acid 25% aqueous ethanol로 10時間 동안 ampholine을 씻어내고 0.25%(w/v) Coomassie Brilliant Blue로 染色하였다.

8. SDS-PAGE 電氣泳動法에 依한 RFP分子量 測定

Laemmli 方法에 準하여 0.1% SDS-PAGE로 10% 濃度에서 分析하였으며 RFP의 分子量은 相對的 移動度로 測定하였다. phosphorylase b(94,000), albumin(67,000), ovalbumin(43,000), carbonic anhydrase(30,000), Trypsin inhibitor(20,100), α -lactalbumin(14,400)을 分子量測定의 標準蛋白質로 利用하였다. 桑育區와 人工飼育區 50% acetone 沈澱分劃 100 μ l와 0.5M Tris buffer(pH6.8) 20 μ l, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol을 加하여 泳動用試料를 만들고 100°C에서 5分間 끓인 後 各 50 μ l씩 gel上에 loading하였다. marker protein 亦是 같이 處理하여 5 μ l gel上에 loading하였다. 25mA 定電流에서 4時間 泳動한 後 染色은 0.25% Coomassie Brilliant Blue로 하고 脫色은 7% TCA溶液으로 하였으며 標準直線을 作成한 다음 RFP의 分子量을 測定하였다.

9. Sephadex G-75 permeation column chromatography

(i) gel充填; 5倍用의 0.04M phosphate buffer(pH

7.5)에 녹인 Sephadex gel을 一夜 平衡化시킨후 gel 溶液을 저어서 신속하게 沈降하지 않는 gel은 버리고 gel이 신속하게 沈降할 때 까지 反復한 다음 vacuum pump로 20分 脫氣하였다. 같은 buffer 溶液으로 미리 充填시킨 gel column에 (16×400mm) gel을 천천히 부어넣고 buffer 溶液으로 平衡化시켰다.

(ii) acetone으로 分割한 桑育蠶과 人工飼料育蠶消化液 各 0.7ml을 gel上에 loading시킨 후 0.2MNaCl-0.04M Phosphate buffer에 의해 20ml/h의 速度로 溶出시키고 fraction collector로 3ml씩 分取했다.

III. 結果 및 考察

1. 消化液의 赤色螢光의 觀察結果

紫外線下에서 桑葉育蠶의 消化液은 赤黃色을 나타내고 人工飼料育蠶의 消化液은 黃色을 나타냈다. 한편, 桑育蠶消化液原液에 acetone(50% 飽和), n-butanol, methanol을 各各 處理하고 일정시간이 經過한 後 紫外線下에서 赤色螢光을 觀察한 結果 acetone에서는 沈澱部分에 赤黃色의 赤色螢光이 觀察되었고 n-butanol에서는 不溶性部分에서, methanol에서는 可用性部分에서 赤色螢光이 觀察되었다.

2. 各區 消化液蛋白質의 PAGE 依한 比較 結果

7.5% polyacrylamide gel로 消化液原液을 30mA의 定電流에서 3時間 電氣泳動한 結果 Fig. 1과 같이 分離되었으며 兩區에서 거의 같은 위치에 3本の 뚜렷한

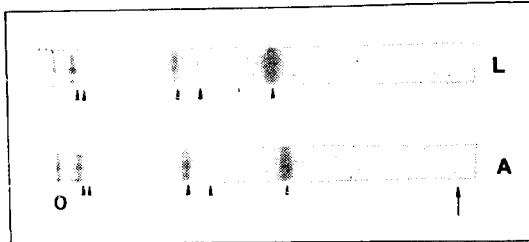


Fig. 1. 7.5% Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of digestive fluid in *Bombyx mori*. Electrophoresis in 7.5% PAGE prepared according to the method of Weber and Osborn was performed at 30mA constant current for 3 hours. 70 μ l of sample solution was applied to each gel. Staining was with 0.25% (W/V) Coomassie Brilliant Blue. Destaining was with 7% Trichloroacetic acid. Symbols: (O) Origin (L) mulberry leaves rearing *B. mori* (A) artificial. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

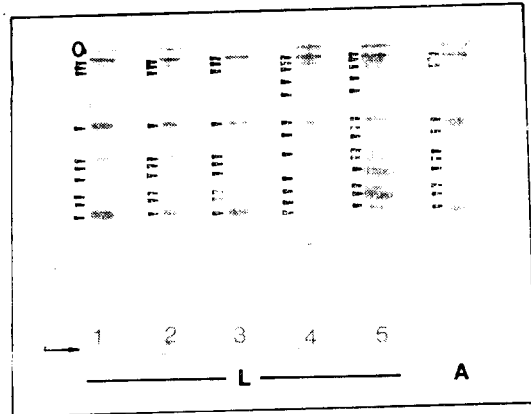


Fig. 2. 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis patterns of digestive fluid precipitated with 50% acetone solution. Electrophoresis in 7.5% polyacrylamide gel prepared according to the method of Weber and Osborn was performed at 30mA constant current for 3 hours. 50 μ l of sample solution was applied to each gel. Staining was with 0.25% (W/V) Coomassie Brilliant Blue. Destaining was with 7% Trichloroacetic acid. Symbols: (O) Origin (L) mulberry leaves rearing *B. mori*, From 5 instar 1st day to 5th day (A) artificial. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

band가 나타났다. 赤色螢光蛋白質의 泳動像을 調査하기 위해 染色하기 前에 254nm에서 觀察한 結果 移動도가 가장 작은 첫번째 band의 位置에서 赤色螢光이 나타났으나 人工飼料區에서는 赤色螢光是 觀察되지 않았다.

7.5% polyacrylamide gel로 消化液 50% acetone 分割을 電氣泳動한 結果는 Fig. 2와 같았다. 30mA의 定電流로 3時間 泳動하였으며 泳動後 染色하기 前에 紫外線으로 調査한 結果 桑育蠶에서는 亦是 첫번째 band의 位置에서 赤色螢光이 觀察되었으나 人工飼料區에서만 赤色螢光是 나타나지 않았다. 消化液原液의 電氣泳動像에서 觀察된 3本の band外에 어느 區에서나 거의 같은 位置에 있는 12~13本の band가 더 관찰되었다.

桑育蠶 5齡 齡期別 消化液蛋白質은 5齡 3日까지 變化가 없으나 5령 4, 5日경 移動도가 큰 band에서 蛋白質의 濃度에 差異가 있었다.

10% polyacrylamide gel로 消化液 50% acetone 分割을 電氣泳動한 結果는 Fig. 3과 같았고 赤色螢光是 桑

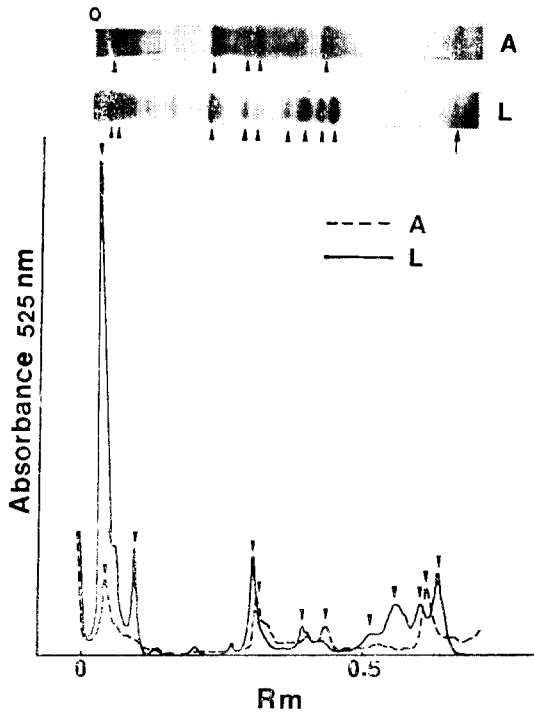


Fig. 3. 10% polyacrylamide gel electrophoresis patterns of digestive fluid precipitated with 50% acetone solution. Electrophoresis in 10% polyacrylamide gel was performed at 25mA constant current for 5 hours. 50 μ l of sample solution was applied to each gel. Staining was with 0.25% (W/V) Coomassie Brilliant Blue.

Symbols: (O) Origin (A) Artificial (L) mulberry leaves rearing *B. mori*. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

葉育蠶의 첫번째 band에서만 觀察되었다. 60 μ l의 sample을 loading하고 25mA의 定電流를 通하여 5時間 泳動한 結果 移動도가 작은 band는 兩區間에 差異가 없었으나 移動도가 큰 部分에서 兩區間에 差異가 있었다.

赤色螢光蛋白質이 pH8.8의 泳動 gel內에서 移動도가 굉장히 작은 것은 이 蛋白質이 鹽基性일 것이라고 생각되어 等電點電氣泳動을 利用하여 RFP의 等電點을 確認했다.

紫外線下에서 赤色螢光의 位置를 確認한 다음 PH를 測定한 結果 RFP의 等電點은 8~9의 鹽基性 蛋白質이었다. 赤色螢光이 觀察된 位置와 Coomassie Brilliant Blue에 染色된 位置는 同一하였다.

以上の 消化液의 紫外線下의 觀察과 電氣泳動結果로부터 赤色螢光을 發하는 蛋白質 즉 RFP는 桑葉育蠶에

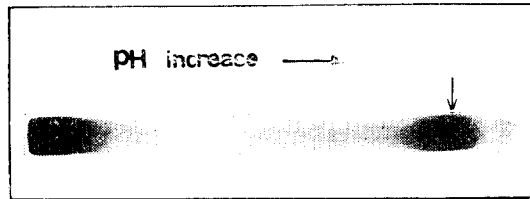


Fig. 4. Electrofocusing in 4% polyacrylamide disc gel electrophoresis containing 2% Ampholine pH range 3-10. Polyacrylamide gel containing 2% ampholine was prepared according to the method of Svensson and Vesterberg. The Protein samples were dissolved in 2% Ampholine, 30% glycerol. Electrophoresis was carried out at 200V constant voltage for 10 hours, then 400V constant voltage 1 hour. After IEF, gels are soaked in TCA for 1 hour, then rinsed with 8% acetic acid 25% aqueous ethanol for 10 hours and stained with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue.

는 存在하지만 人工飼料蠶에는 存在하지 않는 것으로 밝혀졌고 polyacrylamide gel上에서 泳動位置는 移動도가 작은 첫번째 band였으며 等電點電氣泳動結果 RFP는 PI 8~9의 鹽基性蛋白質이었다. 한편, 西田(1974) 등은 人工飼料育蠶中の 赤色螢光缺如蛋白質의 存在를 確認하였는데 RFP와 分子量이 거의 같은 이 赤色螢光缺如蛋白質은 人工飼料區 電氣泳動 gel에서 RFP와 位置가 같은 첫번째 band에 位置하는 것으로 推定된다.

消化液原液을 電氣泳動한 경우 4~5本の band가 나타났지만 수배로 濃縮한 50% acetone 分割 電氣泳動像에서는 14~17本の band가 나타났으며 桑育區와 人工飼料區 電氣泳動像은 移動도가 큰 band部分에서 兩區는 差異가 있었다. 이는 人工飼料과 桑葉의 成分의 差異에서 起因되는 것으로 보인다. 桑育蠶의 경우 經過日數에 따라 泳動像에 差異가 있었는데, 5령 3日까지는 變化가 없으나 5령 4, 5日 移動도가 큰 band의 濃度에 差異가 있었다. 이는 生理代謝의 變化특히 絹蛋白質合成과 關聯된 物質의 需給을 위해 中腸의 圓筒細胞로부터 消化管으로 分泌되는 酵素蛋白質의 活性變化 때문이라고 생각된다.

3. 0.1% SDS-PAGE 電氣泳動法에 依한 RFP 分子量 測定

marker protein을 利用하여 calibration curve를 作成하였다. 各 marker protein의 相對的 移動도는 다음과 같다; phosphorylase b, 0.301 albumin, 0.365 ovalbumin, 0.532 carbonic anhydrase, 0.763 Trypsin inhibitor, 0.859 α -lactalbumin, 0.955. 단백질의 相對的 移

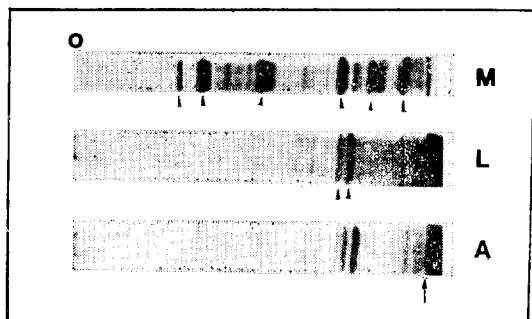


Fig. 5. Stained gels of standard marker proteins and digestive fluid proteins precipitated with 50% acetone solution. The protein samples were dissolved in 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol in 0.5M tris buffer (pH6.8) and heated to 100°C for 3min. 10 μ l of marker proteins and 50 μ l of sample were applied to 10% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS prepared according to the method of Lammler. Electrophoresis was carried out at 25mA constant current for 4 hours. Symbols: (O) Origin (M) marker proteins (L) mulberry leaves rearing *B. mori* (A) artificial. Arrow with bar indicates point of migration of tracking dye during electrophoresis.

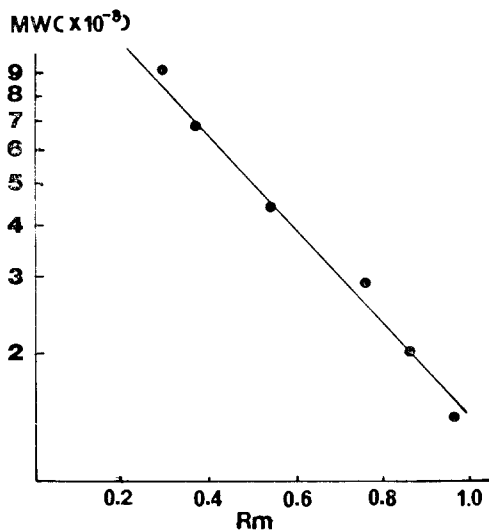


Fig. 6. Calibration curve established using the low molecular weight calibration kits for SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel. marker proteins: Phosphorylase(94,000) albumin (67,000), ovalbumin (43,000) carbonic anhydrase (30,000), Trypsin inhibitor (20,000), α -lactalbumin (14,400).

動度를 X축으로 하고 分子量의 log값을 Y축으로 하여 標準直線 $Y = -0.9447X + 5.1709$ 를 얻고 이 式으로 부터 分子量을 求하였다.

分子量 30,000附近에 桑育區와 人工飼料育區 모두 두개의 鮮명한 band를 나타냈으며 여러개의 minor band가 存在하였다. marker protein을 染色한 gel에서 보이는 微量 band들은 B.P.B. line의 擴散과 脫色の 不充分 때문에 생긴 것이다. 鮮명한 두개의 band는 兩區 各各 分子量이 29,000과 27,000이었다. 最近(1984, 林屋) 純粹分離된 RFP의 分子量이 27,000~28,000이라고 報告된 바에 依하면 桑葉區에서 RFP는 두개의 band中 아래의 것이라고 推定된다. 반면에 人工飼料區에서는 아래의 band가 赤色螢光이 缺如된 中腸蛋白質이라고 推定된다.

4. Sephadex G-75 Permeation Chromatography

에 依한 桑育區와 人工飼料區의 比較

(1) 桑葉區 chromatogram

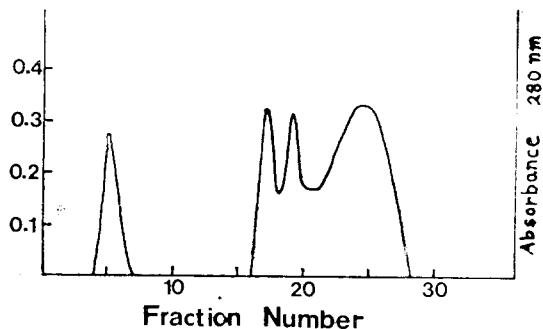


Fig. 7. Elution profile of mulberry leaves rearing *B. mori* chromatographed on sephadex G-75. 0.7ml of sample solution was loaded to the Sephadex gel. The rate of elution was 20ml per an hour.

(2) 人工飼料區 chromatogram

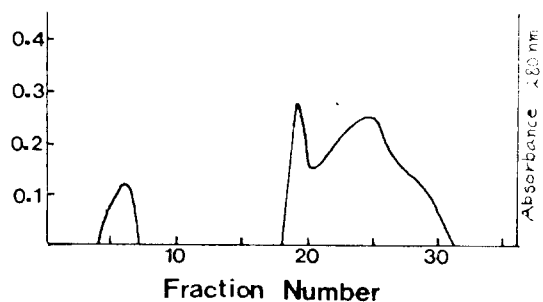


Fig. 8. Elution profile of artificial diet rearing *B. mori* chromatographed on Sephadex G-75. 0.7ml of sample solution was loaded to the Sephadex gel. The rate of elution was 20ml per hour.

桑葉育蠶區와 人工飼料育蠶區의 消化液 50% 沈澱分劃을 Sephadex G-75 permeation chromatography한 結果는 Fig. 7, 8과 같았다.

桑葉區의 chromatogram을 보면 4번에서 7번 分劃에 하나의 吸收帶가 있고 16번부터 28번 分劃에 3개의 吸收帶가 있음을 알 수 있다. 反面 人工飼料育蠶區 chromatogram은 4, 5번 分劃에 낮은 吸收帶가 있고 18번부터 31번 分劃에 2개의 吸收帶가 있었다.

既報에서는(1971, 林屋 등) 3개의 吸收帶中 第一의 吸收帶에 赤色螢光이 集中되어 있다고 報告하였는데 本實驗에서도 3개의 吸收帶를 얻었고 그 中 第一의 吸收帶에 RFP가 存在할 것이라고 推定된다.

人工飼料區에서는 第一의 吸收帶와 두개가 重複되어 있는 第二의 吸收帶가 있으며 第一의 吸收帶에 赤色螢光이 缺如된 中腸蛋白質이 存在하는 것으로 推定된다.

IV. 綜合考察

家蠶의 中腸 消化液에 存在하는 赤色螢光蛋白質은 桑葉으로 飼育한 家蠶의 消化液에는 存在하지만 桑葉 粉末이 添加되지 않은 人工飼料로 飼育한 家蠶의 消化液에는 存在하지 않는다는 點과 蠶의 耐病性과 關聯이 있다는 點, 특히 RFP와 家蠶 NPV와의 反應이 哺乳動物의 抗原·抗體反應과 유사하다는 點에서 注目을 받고 있다.

林屋 등에 의해서 지금까지 밝혀진 RFP의 in vitro 生成反應은 桑葉中の chlorophyll a와 家桑中腸圓筒細胞에서 만들어지는 中腸蛋白質이 結合하여 RFP가 合成되는 것으로서 chlorophyll a는 中腸蛋白質과 結合하기 前에 吡啉중의 chlorophyllase에 의해 phytol 꼬리가 잘려진 chlorophyllide a로 되고 chlorophyllide a는 中腸蛋白質과 結合하여 RFP의 前驅體인 複合體를 形成하고 이것에서 porphyrin環이 開閉되면 RFP의 合成은 完結된다. RFP의 合成反應에는 桑葉中の chlorophyll a, chlorophyllase, 家蠶中腸由來의 中腸蛋白質, 光과 酸素가 關與한다는 것이 in vitro에서 밝혀졌으나 in vivo 反應界에서 다른 어떤 成分이 關與하고 있는지 특히 phytol 꼬리가 잘려진 chlorophyllide a가 中腸蛋白質에 結合되는 過程등은 아직 밝혀지지 않고 있다.

한편, RFP의 virus 不活化作用에 關해 林屋등은 RFP와 家蠶 NPV와의 沈澱反應을 電子顯微鏡으로 確認했는데 viral envelop이 RFP의 攻擊에 의해 破壞된다는 點과 nucleocapside가 거의 消失된다는 點에서 哺乳動物의 抗原·抗體反應과 다르고 또한 RFP는 FV, AcNPV

와도 反應하는 것으로 林屋 등은 報告했는데 家蠶 NPV와 FV의 構造가 다르다는 點을 미루어 볼 때 RFP가 作用할 수 있는 Virus 범위가 더 많을 수도 있다고 생각된다. RFP가 virus와 作用할 때 重要的 役割을 하는 것은 開閉된 porphyrin環의 酸化·換源作用이라고 생각되나 이것에 關해서는 앞으로 더 많은 研究가 있어야 될 것이라고 생각된다.

本 研究에서 行한 實驗의 結果 紫外線下에서 赤色螢光을 發하는 RFP는 pH8.9의 polyacrylamide gel 內에서 잘 泳動되지 않는 等電點 8~9의 鹽基性蛋白質이고 SDS-電氣泳動法으로 推定한 RFP의 分子量은 27,000 정도로서 林屋 등이 報告한 27,000~28,000과 대체적으로 一致하고 Sephadex G-75 permeation chromatography profile도 既報들과 一致하였으나 純粹分離의 단계엔 이르지 못했다. RFP를 純粹分離하기 위해서는 몇단계의 chromatography 過程이 더 必要하고 赤色螢光을 測定할 수 있는 赤色螢光光度計가 반드시 必要하기 때문에 polyacrylamide gel의 pH를 10以上으로 상승시킨 電氣泳動法을 利用하는 것이 더 容易하다고 생각되며 gel內에서 RFP의 位置는 紫外線下에서 쉽게 確認될 수 있다.

V. 摘 要

人工飼料開發研究의 一環으로 桑育蠶과 人工飼料育蠶 消化液에 對한 基礎資料를 얻기 위해 桑葉育蠶과 人工飼料育蠶을 共試하고 比較·分析하여 아래와 같은 結果를 얻었다.

1. 赤色螢光蛋白質은 50% 飽和 acetone 用液에 沈澱하였고 n-butanol用液중에 用解되지 않았으며, methanol 用液에는 用解되었다.
2. 桑育蠶과 人工飼料育蠶消化液 acetone分劃 電氣泳動은 移動도가 큰 蛋白質 band 部分에서 뚜렷한 差異가 있으며 桑葉區에서단 첫번째 band에서 赤色螢光이 觀察되었다.
3. 經過日數에 따른 桑育蠶消化液 電氣泳動像은 5齡 1~3日에는 變化가 없으나 5齡 4, 5日에 移動도가 큰 band에서 變化가 있었다.
4. 等電點電氣泳動結果 RFP는 PI 8~9의 鹽基性蛋白質이었다.
5. 桑育蠶消化液 acetone 分劃의 SDS 電氣泳動像에 RFP로 推定되는 band가 나타났고 그 分子量은 27,000 이었다.
6. 桑育蠶과 人工飼料育蠶消化液의 Sephadex G-75 permeation chromatography 結果 桑育區 chromatogram

에서는 16번부터 28번 사이에 3개의 吸收帶가 있었으며 人工飼料區 chromatogram에서는 18번부터 31번 사이에 2개의 吸收帶가 있었다.

引 用 文 獻

- Aizawa, K. (1962) *J. Insect pathol.* 4, 72-76.
- Aruga, H. and Watanabe, H. (1964) *J. Insect Pathol.* 6, 387-394.
- Acrotyd, J.F. (1964) *Immunological Methods*, Blackwell Scientific Pub, Oxford, pp.143-155.
- Briggs, J.P. (1968) *J. Exp. Zool.* 138, 155-188.
- Barrett, J. (1967) *Nature.* 215, 733-735.
- Brendel, M., and R.W. Kadlan (1967) : *Molec. Gen. Genetics.* 99, 181-190.
- Gilmour, D. (1963) 昆蟲生化學, 271-273.
- Gomyo, T. and Y. Sakurai (1967) *Agr. Biol. Chem.* 31, 1474-1481.
- Gomyo, T.Y. Yang and M. Fujimaki (1968) *Agr. Biol. Chem.* 32, 1061-1069.
- Gray, C.H. (1953) *The Bile Pigments*, 129 Methuen & London.
- Haiicri, A. and Y. Fujita (1959) : *J. Biochem.* 116, 903-909.
- Hayashiya, K. Nishida and Maisubara, F. (1968) *J. Eetomal Zool.* 12, 189-193.
- Hayashiya, K. Matsubara, F. Nishida, J. and Kawamoto, F. (1961). *Bull. Fac. Textile Sci. Kyoto Univ. Ind. Arts. Textile Fibers.* 6, 87-100.
- Hayashiya K. Uchida, Y. and Himeno, M. (1978) *J. Entomol Zool.* 25, 238-242.
- Hayashiya, K.J. Nishida and F. Matubara (1969), *Appl. Ent. Zool.* 4, 154-155.
- Holden, M. (1961) *Biochem. J.* 78, 359-364.
- Köhler, G. and Milstein. C. (1975) *Nature.* 256, 495-497.
- Lozlov, E.A. and Alexeenko, I.P. (1967) *J. Invertebr. pato.* 9, 413-419.
- Knosaka, T.M. Himeno and Onodear (1971) *J. Virology* 7, 267-273.
- Kusuda, J. and J. Mukai (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* 3913, 317-323.
- Klein A.O. and W. Vishnia (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2544-2547.
- Krossing, G. (1940) *Biochem. Zeits.* 305, 359-373.
- Kamon, E. and Shulov A. (1965) *J. Inverbr. Path.* 7, 192-198.
- Katoh, S. and A. Takamiya (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 102, 189-200.
- Lowly, O.H., N.J. Roserrough, A.L. Fara and R.J. Ranoall (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mclaren, A.D. and D. Shugar (1964) *photochemistry of proteins and nucleic acids* pergamon press Inc. London.
- OT.V.T. and Herzenberg, L.A. (1980) In "Selected Methods in cellular Immunology, 351pp. W.H. Freeman and Company.
- Sheraga, H.A. and Mandelkern, L. (1953) Consideration of the hydrodynamic properties of proteins *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 179-184.
- Stephens, J.M. (1959) Immune responses of some insects to some baterial antigens. *Canad. J. Microbiol.* 5, 203-228.
- Svensson, H. (1962) Isoelectric fractionation analysis and characterization of ampholytes in natural PH gradient II. Buffering capacity and conductance of isoionic ampholytes. *Acta Chem. Scand.* 16, 456-466.
- Suzuki, K. (1936) Researches on the silkworm pdyhedrosis, I-VII, *Bull. Koyto Sericult College* 1, 225-338.
- Svedber, T. and Pederson, K.O. (1940) "Ultracentrifuge" p.445, Oxford Univ. Press. (Clarendeo), Oxford.
- Tinsley, T.W. (1976) Factors affecting virus infection of insect gut tissue. In "Invertebrate Immunity" pp.55-63. Academic Press' New York.
- Utsumi, S. and Nishimura, T. (1982) On the anti-Streptococcus protein (ASP) in the dijestive juice of silkworm larvae. *Bombyxmori J. Sericult. Sci. Japan.* 51, 84-92.
- Vesterberg, O. (1971). Electrophoresis procedures. In "Methods in Enzymology" Vol. XXVII. p.389 Academic Press, New York.
- Weber, K.P. and Osborn, M. (1972) Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gels. In "Methods in Erzymology" Vol. XXVI. p.3. Academic Press New York.
- Yuco Uchida, F. Kawamoto, M. Himeno, K. Hayashiya (1984). A Virus-Inactivating Protein Isolated

from the Digestive juice of the silkworm, *B. mori*.
向井純一郎・武谷立子・稻益正徳 阿久根了(1969). 家
蠶消化液의 赤色螢光蛋白質-Tryptophan 光分解増感
作用 ならび生成起原에 において. 日蠶誌 38(6), 437-
443.
西田 順(1974). 家蠶消化液赤色螢光蛋白質의 生成機構.
日本應用動物昆蟲學會誌 第18卷 第3號:126-132.
林屋慶三・内田由子・西田順, (1976) 明および 暗飼育

したカイコの 赤色けい光たんぱく質の 生成とウイル
ス抵抗性, 日本應用動物昆蟲學會誌, 第20卷, 第3號:
139-143.
内田由子・林屋慶三 (1981) カイコ幼蟲消化液中의 赤
色けい光たんぱく質(RFP)의 生成機構, クロロフィ
リド-a-中腸たんぱく質複合體의 形成. 日本應用動物
昆蟲學會誌 第25卷, 第2號:94-100.