

鱗翅目 昆蟲의 成蟲體液蛋白質에 관한 生理生化學的 研究

1. 家蠶의 成蟲特異體液蛋白質의 檢出

成洙一·文在裕*·李相夢**尹馨珠**

水原大學 生物學科 *서울대학교 農科大學 **農村振興廳 蠶業試驗場

Physiological and Biochemical Studies on the Adult Hemolymph Proteins in *Lepidoptera*.

1. Appearance of Adult Specific Proteins in the Hemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*.

Su Il Seong, Jae Yu Moon*, Sang Mong Lee** and Hyung Joo Yoon**

Department of Biology, Suwon College. *College of Agriculture, Seoul National University.

**Sericultural Experiment Station, R.D.A.

Summary

Adult specific proteins, referred to as ASP-I (adult specific protein of slow mobility) and ASP-II (adult specific protein of fast mobility) at the pharate adult stage of the silkworm, *Bombyx mori*, were detected by polyacrylamide gel electrophoresis. The adult specific proteins (ASP-I and ASP-II) were defined as a kind of adult hemolymph proteins without sex specificity, and there was no variation in the respective electrophoretic mobility of ASP-I and of ASP-II among the forty-one silkworm varieties. tested.

I. 緒 論

昆蟲의 體液蛋白質에 對한 研究는 Telfer & Williams (1953) 및 Telfer(1954)에 의해 *cecropia* 나방(*Hyalophora cecropia*)으로부터 雌特異蛋白質이 보고된 이래 數種의 蛋白質이 分離·精製되어 그들의 分子的 및 生理的 機能이 밝혀지고 있으며 특히 이러한 體液蛋白質은 脫皮나 變態 등의 發育段階에 따라 質的 및 量的으로 變化하고 있음이 보고되고 있다(Nakasone & Kobayashi, 1965; 江口等, 1966; 土井良, 1968).

지금까지 發表된 鱗翅目 昆蟲의 主要體液蛋白質로는 幼蟲期에서 成蟲期까지 存在하여 diglyceride, cholesterol, carotenoid, paraffin 등 脂質成分을 運搬하는 lipophorin(Chino *et al.*, 1981; Chino & Downer, 1982; Chino *et al.*, 1981; Chino & Kitazawa, 1981; Katase & Chino, 1982; 茅野·富野, 1985; 茅野, 1987),

蛹 또는 成蟲期에 存在하여 장차 알의 主要卵黃蛋白質이 되는 vitellogenin(Telfer, 1953, 1954; Pan *et al.*, 1969; 稻神, 1954; 鮎澤等, 1960; Nakasone & Kobayashi, 1965; 江口等, 1966; 土井良, 1968; Doira & Kawaguchi, 1972; Cno *et al.*, 1975; 井口·中井, 1978; Wyatt & Pan, 1978), 終齡幼蟲에서 蛹初期까지 存在하여 成蟲化發育 過程에 關여하는 貯藏蛋白質(SP₁, SP₂; Tojo *et al.*, 1980; 尹等, 1987) 및 MHPs(major hemolymph proteins: Seong *et al.*, 1985; 成, 1986), 5齡初期에서 蛹後期까지 存在하여 광의의 vitellogenin으로 정의되는 소분자 lipoprotein(30K protein: Gamo 1978; Izumi *et al.*, 1981; Hagedorn & Kunkel, 1978) 등을 열거할 수 있다.

이와같이 昆蟲의 變態에 따른 體液蛋白質에 관한 研究는 특히 이들 蛋白質의 機能의 解析과 關連하여 주로 幼蟲期와 蛹期를 대상으로하여 이루어지고 있으나, 生殖과 飛翔을 生理機能의 主目的으로하는 成蟲期에

관한 體液蛋白質의 研究는 극히 제한되어 있고, 특히 누에 成蟲에 대한 研究는 전혀 이루어지지 않고 있다.

본 연구자들은 數種의 昆蟲의 成蟲化發育에 따른 物質의 變化過程을 通하여 昆蟲의 後胚子의 發育段階中 成蟲化가 갖는 生理的 의미의 해석을 시도하던 중 누에 빈대기의 羽化와 함께 多量으로 檢出되는 成蟲特異性 體液蛋白質에 대한 몇가지 知見을 얻었기에 이에 보고하는 바이다. 本 研究는 1987年 韓國科學財團 일반(기초) 연구지원비에 의하여 수행되었음을 밝혀둔다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗昆蟲

實驗에 使用한 누에 品種은 蠶業試驗場에서 保有하고 있는 保存蠶品種인 日本種系 15品種, 中國種系 14品種, 유럽종系 8品種, 熱帶種系 3品種, 韓國種系 1品種 등 모두 41品種이었으며 飼育은 87年 春蠶期에 蠶業試驗調查標準에 準하였다.

2. 試料의 調製 및 電氣泳動

누에의 卵蛋白質 抽出은 羽化 직후의 누에나방으로부터 完成卵이 들어있는 卵巢小管을 꺼집어내어 冷 PBS 緩衝液으로 충분히 洗淨하고 알의 重量에 對해 10배액의 冷PBS액으로 마쇄한 후 5°C에서 10分間 遠心分離 (12,000rpm)하여 그의 상등액을 전기영동의 試料로 使用하였다.

體液는 幼蟲, 빈대기, 成蟲으로부터 分析에 필요한 時期에 알·수벌로 적당량 채취하였고 채취는 시험관내에 소량의 phenylthiourea를 넣어 體液의 melanosis를 防止하였다. 채취한 體液은 3000rpm에서 15分間 低溫遠心하여 그 상등액을 使用時까지 -20°C에 冷凍 保管하였다.

電氣泳動은 Davis(1964) 方法에 따라 slab型 polyacrylamide gel을 使用하였으며, 이때의 分離 gel의 농도는 7.5%였다. 영동완료후 染色은 coomassie brilliant blue R-250으로, 脫色은 7% 醋酸液으로 각각 行하였다.

III. 結果 및 考察

그림 1은 누에의 發育時期別 體液蛋白質의 電氣泳動像을 나타낸 것이다. 體液蛋白質成分은 各 發育時期別 고유의 泳動 패턴을 보이고 있으며, 이중 化蛹 5日과 羽化를 전후한 兩時期의 體液蛋白質의 比較를 通하여 누에의 成蟲化 發育에 따르는 蛋白質成分의 變化를 알 수 있었다. 특히 羽化와 함께 뚜렷한 變化를 보인것은 빈대기 時期의 소위 30K 蛋白質으로 알려진 MHPs(Seong

et al., 1985)가 거의 消失된 반면 몇개의 成蟲 特有的 蛋白質이 새롭게 나타난 것이다 하겠다. 이들중 移動 速度를 달리하는 2개의 蛋白質成分은 다른 蛋白質成分에 比하여 量的으로 뚜렷하였으며 이 두 成分은 羽化前日의 pharate adult의 體液에서 最初로 出現하여 羽化後 成蟲의 生存이 可能한 4~5일까지도 存續하고 있음이 밝혀졌다(未發表).

이 두개의 成蟲特異蛋白質에 對하여 移動速度가 느리고 高濃度를 보이는 成分을 ASP-I(Adult specific protein of slow mobility), 移動速度가 빠르고 比較的 低濃度를 나타내는 成分을 ASP-II(Adult specific protein of fast mobility)라 各各 名命하였다.

또한 成蟲特異蛋白質의 알·수간의 差異를 調査한 結果 ASP-I, ASP-II 共히 알·수의 成蟲體液에서 檢出 되므로서(Fig. 1) 이들 蛋白質의 出現이 vitellogenin이나 storage protein과는 달리 性에 依해 支配되지 않음이 확인되었다.

한편, 羽化와 함께 나타나는 成蟲特異蛋白質이 누에 品種間에 共通의으로 存在하는 蛋白質인지의 여부를 3個의 品種(Nakdong, SC, Jam109)을 대상으로 調査한 結果 어느 品種의 成蟲體液에서나 다같이 存在함이

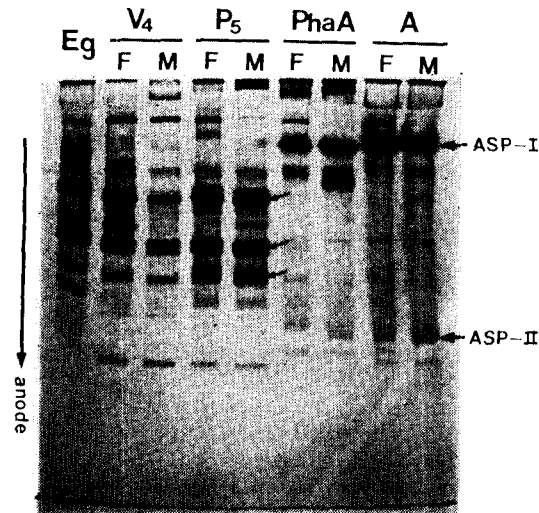


Fig. 1. Appearance of adult specific proteins referred to as ASP-I of slow mobility and ASP-II of fast mobility at the very pharate adult stage of the silkworm, *Bombyx mori*. Eg, egg; V₄, four-day old larvae at the 5th instar; P₅, five-day old pupae; PhaA, pharate adult just before adult emergence; A, silkworm moth just after adult emergence; F, female; M, male. Arrows indicate the major haemolymph proteins (MHPs) (Seong, 1985),

Table 1. Distribution of adult specific proteins(ASP-I, ASP-II) in each silkworm variety derived from the corresponding geographical origins.

Geographical origins of the silkworm varieties.	Japanese	Chinese	European	Tropical	Korean	Total
Description						
No. of the silkworm varieties tested	15	14	8	3	1	41
No. of the silkworm varieties showing the ASP-I	15	14	8	3	1	41
No. of the silkworm varieties showing the ASP-II	15	14	8	3	1	41

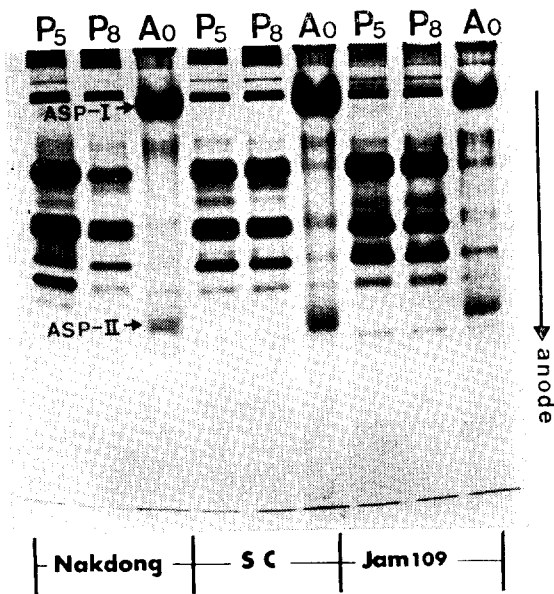


Fig. 2. Representative appearance of adult specific proteins in the haemolymph of the very adults collected from different silkworm varieties which are represented as Jam 109 for Japanese, SC for European, and Nakdong for Chinese. P₅, P₈ and A₀ denote the five-day old pupae, the eight-day old pupae, and the very silkworm moth just after adult emergence, respectively.

밝혀졌다(Fig. 2).

다음, ASP-I 및 ASP-II의 전기泳動의 移動速度에 對한 品種間 變異性을 調査하였다. 즉, 蠶業試驗場에서 現在 保有하고 있는 品種들 가운데 日本種 15品種 中國種 14品種, 유럽種 8品種, 熱帶種 3品種, 韓國種 1品種을 대상으로 調査한 結果, 成蟲體液蛋白質 ASP-I 과 ASP-II의 移動速度에는 누에 品種間的 變異성이 전혀 보이지 않았다(Fig. 3, Table. 1).

이상과같이 成蟲體液特異蛋白質의 出現時期, 性特異

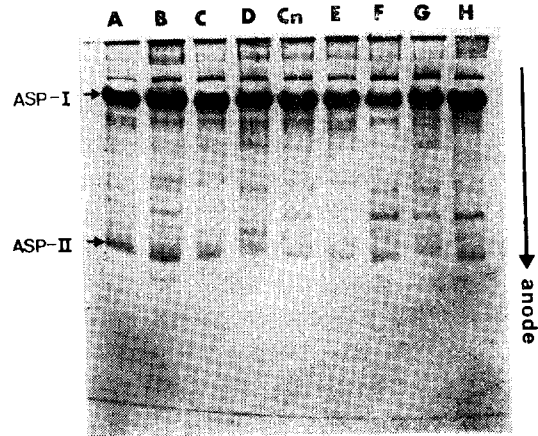


Fig. 3. Detection of variation in the electrophoretic mobility of the adult specific proteins (ASP-I and ASP-II) among the silkworm varieties tested. Cn represents control haemolymph which contains all samples of A to H. The abbreviations of A to H exhibit denotement of the silkworm varieties tested. A, SC; B, Jam 109; C, SA₇; D, N₄₃; E, C₅₃; F, SA₂; G, N₁₈; H, C₂₈.

性, 品種間的 變異性등에 關하여 알아보았으나, 일반적으로 昆蟲의 發育段階에 따른 體液蛋白質의 電氣泳動像은 比較的 점진적인 新生, 消滅의 樣相을 보이고 있는데 反하여 成蟲特異蛋白質은 羽化와 함께 比較的 갑자기 出現하므로써 本 蛋白質이 成蟲體의 完成, 혹은 羽化 以後 成蟲의 유지와 關聯하여 어떠한 生理的 機能을 담당하고 있지 않을까 추정된다. 成蟲特異蛋白質의 羽化過程 혹은 羽化後 成蟲體內에서의 生理的 機能은 아직 밝혀지 못하고 있으나, 이 蛋白質이 成蟲化變態에 있어서 成蟲形質發現의 生化學的 標識因子임을 分명하며 이에 對한 遺傳學的 및 生理學的 研究가 기대된다. 現在 本 蛋白質에 對한 近緣昆蟲과의 免疫學的 類緣性, 化學的 性狀 및 機能解析 등에 對한 研究가 進行되고 있다.

IV. 摘 要

누에의 羽化와 함께 새로이 出現하는 成蟲特異體液 蛋白質(ASP-I, ASP-II)의 檢出, 性特異性, 品種間 分布 및 變異性에 關하여 PAGE 電氣泳動法을 利用 實驗한 結果,

1. 羽化와 함께 알, 幼蟲, 번데기의 發育時期에는 出現하지 않는 2가지의 새로운 成蟲特異蛋白質 泳動帶가 檢出되었으며, 移動도가 느린 泳動帶를 ASP-I(Adult specific protein of slow mobility), 빠른 泳動帶를 ASP-II(Adult specific protein of fast mobility)로 名命하였다.

2. 成蟲特異體液蛋白質(ASP-I, ASP-II)은 性特異性 이 없었다.

3. 實驗에 使用된 모든 누에 品種의 成蟲體液에서 ASP-I 및 ASP-II가 檢出되었으나, 品種間的 變異性 은 인정되지 않았다.

參 考 文 獻

- 鮎澤啓夫・小林勝利・阿部阪子(1960) 카이코における 永續蛹의 體液蠶白의 濾紙電氣泳動. 日蠶雜 29, 197-202.
- Chino, H. and Downer, R.G.H. (1982) Insect hemolymph lipophorin: A mechanism of lipid transport in insects. *Adv. Biophys.* 15, 67-92.
- Chino, H., Downer, R.G.H., Wyatt, G.R and Gilbert, L.I. (1981) Lipophorin, a major class of lipoproteins of insect hemolymph. *Insect Biochem.* 11, 491.
- Chino, H. and Kitazawa, K. (1981) Diglyceride-carrying lipoprotein of hemolymph of locusts and some insects. *J. Lipid Res.* 22, 1042-1052.
- Chino, H., Murakami, S. and Harashima, K. (1969) Diglyceride-carrying lipoprotein in insect hemolymph; purification and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 176, 1-26.
- 茅野春雄・富野士良(1985) 家蠶生化學, pp. 92-129.
- 茅野春雄(1987) 리포호린과 昆蟲. 蛋白質核酸酵素 32 (12), 1413-1421.
- 土井良宏(1968) 變態に伴る 카이코體液蛋白質의 變動. 九 大農學藝雜 23, 205-214.
- Doira, H and Kawaguchi, Y. (1972) Changes in haemolymph and egg protein by the castration and implantation of the ovary in *Bombyx mori*. *J. Fac. Agric. Kyushu. Univ.* 17, 117-125.
- 江口正治・政山亨・西村允子(1966) 家蠶의 變態に伴는 組織蛋白質의 電氣泳動像의 變化. 日蠶誌 35, 435-443.
- Gomo, T. (1978) Low molecular weight lipoproteins in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*: Inheritance, isolation and some properties. *Insect Biochem.* 8, 457-470.
- 井口民夫・中井正憲(1978) 家蠶의 피테로지엔논에 關する 研究 I. 同定とアミノ組成. 蠶試報 27, 579-593.
- 稻神馨(1954) 家蠶體液의 蛋白質에 關する 研究(III). 蛋白質의 電氣泳動像について. 日蠶雜 23, 304-307.
- Hegedorn, H.H. and Kunkel, J.G. (1979) Vitellogenin and Vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 24, 475-505.
- Izumi, S., Fuji, J., Yamada, S. and Tomino, S. (1981) Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 670, 222-229.
- Katase, H. and Chino, H. (1982) Transport of the hydrocarbons by the lipoprotein of insect haemolymph. *Biochim. Biophys. Acta* 710, 341-348.
- Irie, K. and Yamashita, O. (1983) Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*; Purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.* 13(1), 71-78.
- Nakasone, S., and Kobayashi, M. (1965) Acrylamide gel electrophoresis of blood protein during the molting and metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. seric. Sci. Japan* 34, 257-262.
- Ono, S., Nagayama, H. and Shimura, K. (1975) The occurrence and synthesis of female-and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 5, 313-329.
- Pan, M.L., Bell, W.J. and Telfer, W.H. (1969) Vitellogenic blood protein synthesis of insect fatbody. *Science* 165, 393-394.
- Telfer, W.H. (1954) Immunological studies of insect metamorphosis II. The role of sex-limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.* 37, 539-588.
- Telfer and Williams, C.M. (1953) Immunological studies of insect metamorphosis. I. Quantitative and qualitative changes in the blood proteins of the *Cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.* 36, 389-413.
- Tojo, S., Nagata, M. and Kobayashi, M. (1980)

- Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Biochem. 10, 289-303.
- Seong, S.I., Park, K.E., Nagata, M. and Yoshitake, N. (1985) Effect of Metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 2:91-104.
- 成泳一(1986) 누에 體液蛋白質에 관한 生化學的 研究. *韓蠶誌* 28(1) 30-36.
- Wyatt, G.R. and Pan, M.L. (1978) Insect plasma proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 779-817.
- 尹馨珠·李相夢·文在裕(1987) 家蠶의 Vitellogenin에 관한 研究. *韓蠶誌* 29(1) 20-30.