

〈論 文〉

鱗翅目昆蟲의 成蟲體液 蛋白質에 關한 生理·生化學的 研究 II. 누에의 成蟲特異體液 蛋白質의 分離·精製 및 分子的 特性

李相夢·成洙一*·姜珉禎*·文在裕**

農村振興廳 蠶業試驗場, *水原大學校 理科大學, **서울大學校 農業生命科學大學

Physiological and Biochemical Studies on the Adult Haemolymph Proteins in Lepidoptera II. Purification and Molecular Properties of Adult Specific Protein in the Silkworm, *Bombyx mori*

Sang Mong Lee, Su Il Seong*, Hyun Ah Kang* and Jae Yu Moon**

Sericultural Experiment Station R.D.A., Suwon, Korea

*College of Natural Science, The University of Suwon, Suwon, Korea

**College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Isolation, purification and molecular properties of adult specific protein (ASP) were investigated in the silkworm, *Bombyx mori*. ASP was purified from adult haemolymph by gel filtration on Sephadex G-100 and ion exchange chromatography on CM52. The preparation was shown to be homogeneous by native-PAGE and immunoelectrophoresis. The purified protein was consisted of two different subunits with molecular weights of 19.5 kDa and 17.5 kDa, and contained no sugars and no lipids.

Keywords : Silkworm, *Bombyx mori*, adult haemolymph, adult specific protein (ASP), polyacrylamide gel electrophoresis

緒 論

곤충체액단백질의 同定, 比較, 定量을 위해서는 해당 단백질의 분리·정제 및 면역학적인 연구가 매우 중요하다(Wyatt and Pan, 1978). 곤충의 체액단백질에 관해서는 지금까지 arylphorins(Telfer *et al.*, 1983), methionine-rich storage protein(Tojo *et al.*, 1978), lipophorin(Chino, 1985), vitellogenin(Chino *et al.*, 1969, 1976), vitellin(Isumi *et al.*, 1980b), ESP(Irie and Yamashita, 1983), SP1 및 SP2(Tojo *et al.*, 1980), 30 K 단백질(Gamo, 1978; Isumi *et al.*, 1981), MHPs(Seong *et al.*, 1985) 등이 분리·정제되어 그들의 생리·생화학적, 면역학적, 분자적 특성이 밝혀져 있다. 그

러나, 곤충에서의 체액단백질에 관한 연구는 대부분 알, 유충, 번데기의 시기에 집중되어 있고 羽化현상에 초점을 맞추어 조사된 성충시기의 체액단백질에 관한 연구는 거의 보고되어 있지 않다. 저자들은 누에의 羽化와 함께 성충체액에 다량으로 출현하는 성충특이체액단백질(adult specific protein; ASP)의 존재를 발견하고, ASP의 출현시기, 性差, 품종간의 변이 등에 대하여 보고한 바 있다(成 등, 1988).

본 연구는 우화시 출현하는 ASP의 성충체에서의 생리적 기능을 규명하기 위한 연구의 일환으로 우선 ASP의 분리·정제 및 면역화학적 분석을 시도하고, 그 결과로부터 ASP의 물리화학적 성상 및 분자적 특성을 조사하였다.

材料 및 方法

1. 실험근총

본 실험에 사용한 누에는 잠업시험장 육종 제 2연 구실에서 보유하고 있는 限性黃繭육성계통 중의 하나인 6 MB₂ 계통이었다. 공시누에의 催靑, 사육은 잠업시험장의 육잠시험조사표준에 준하였다.

2. 체액채취

체액은 우화 당일의 나방으로부터 소량의 phenylthiourea가 첨가된 차가운 소형시험관에 적당량 채취하였고, 수집된 체액은 4°C에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리한 후 그 상등액을 -20°C에 냉동보관하여, 필요시 꺼내어 사용하였다.

3. Gel filtration

Gel 濾過는 Sephadex G-100(Pharmacia Fine Chemical)을 2.5×50 cm의 column내에 인산완충생리식염수(PBS; 137 mM NaCl, 3.22 mM Na₂HPO₄, 1.22 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)를 사용하여 充積시키고 bed 상단에 성충체액 4 ml를 40% sucrose 2 ml와 잘 혼합한 후 重層하였으며 chromatography시의 流速은 2 ml/cm²/hr로 하였다.

4. Ion exchange chromatography

Ion exchange chromatography는 양이온 交換體인 CM52-cellulose(Whatman Chemicals)를 사용하였다. CM52-cellulose는 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)를 사용하여 1×25 cm column내에 充積시키고 30 ml/hr의 流速으로 chromatography를 행하였다.

5. 전기영동

Native-PAGE는 Davis(1964) 방법에 따라 7.5% Slab형 polyacrylamide gel을 사용하였으며 전기영동 후 gel은 7% 초산액의 0.05% coomassie brilliant blue R-250으로 1일간 염색하고, 7% 초산액으로 수일간 탈색하였다. gel상의 糖은 Schiff시약(Zacharius *et al.*, 1969)으로, 脂質은 Sudan black B(Swahn, 1953)로 각각 염색하여 검출하였다.

SDS-PAGE는 Weber and Osborn(1969) 방법에 준하여 행하였으며, Sigma 제품의 표준단백질(albumin bovine, 66 K; albumin egg, 45 K; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 K; carbonic anhydrase, 29 K; trypsinogen, 24 K; trypsin inhibitor, 20 K; α-lactalbumin, 14 K)을 사용하여 목적 단백질의 분자량을 측정하였다.

6. 抗血清조제

분리정제된 ASP 1 ml를 Freund's complete adjuvant 1 ml와 혼합, 한국실험 동물연구소에서 구입한 수토끼에 1주간격으로 5회 피하주사한 후 全採血하였다. 수집된 抗血清은 56°C에서 30분간 補體의 非動化處理를 행하였으며 방부제로 NaN₃를 0.1% 첨가한 후 -20°C에 냉동보관 하였다.

7. 면역전기영동

면역전기영동은 agarose 1.2%, sodium azide 0.1%, Veronal 10 mM, Veronal-sodium 50 mM, pH 8.6의 조성을 가진 gel상에 항원액을 넣고 Veronal buffer를 사용하여 2 mA/cm의 정전류로 100분간 通電하였다. 영동완료후 抗血清溝를 만들어 항혈청을 넣고 실온에서 1~2일간 면역확산반응을 시켰다.

結果 및 考察

1. 성충특이체액단백질(adult specific protein; ASP)의 분리 및 정제

누에의 성충체액단백질에 대한 gel chromatography의 분석결과는 그림 1과 같다. gel 濾過에서 분리된 누에의 성충체액단백질은 5개의 피크(P1~P5)로 나누어졌으며, 이들 중 P4가 ASP를 다량 포함하고 있음이 확인되었다(그림 3의 G). 이어서 P4분획을 freezing dry하여 일정량의 0.01 M acetate buffer로 용해한 후 ion exchange chromatography의 시료로 사용하였다. ion exchange chromatography를 행하여 CM52 이온교환체에 흡착된 ASP는 0.0~1.0 M NaCl gradient로 용출하였으며 그 결과 약 0.4 M의 NaCl

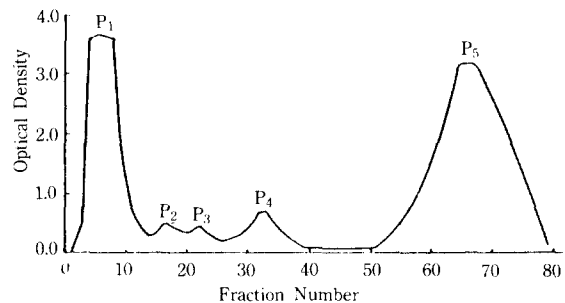


Fig. 1. Elution profile of *Bombyx* adult haemolymph proteins from gel filtration chromatography. The haemolymph was applied to Sephadex G-100 column (i.d. 2.5×50 cm) and eluted with 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.4) at a flow rate of 2 ml/cm²/hr. Protein was monitored at 280 nm. P1, peak 1; P2, peak 2; P3, peak 3; P4, peak 4; P5, peak 5.

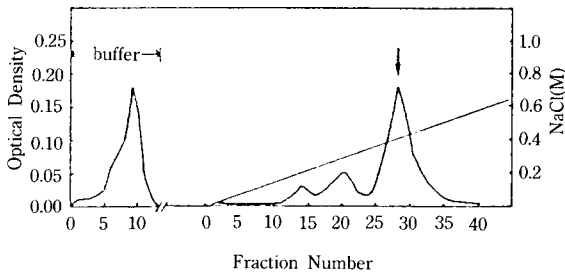


Fig. 2. CM52 ion exchange chromatography of peak 4 (P4) fraction taken from Sephadex G-100 gel filtration. CM52 column was equilibrated with 0.1 M acetate buffer of pH 6.0. The P4 fraction from Fig. 1 was eluted with a NaCl linear gradient (0.0~1.0 M) in the same buffer. The purified ASP was found at the fraction indicated by arrow. The proteins were monitored at 280 nm.

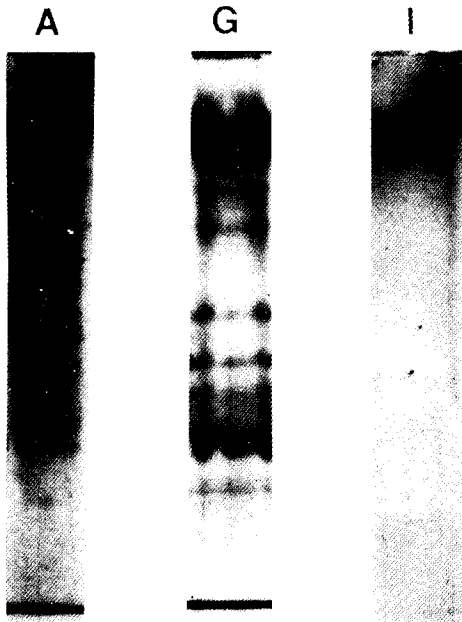


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of *Bombyx* adult haemolymph proteins (lane A), fraction comprising ASP taken from Sephadex G-100 gel filtration (lane G) and purified ASP from CM52 ion exchange chromatography (lane I). The proteins were stained with 0.05% coomassie brilliant blue R-250 in 7% acetic acid solution.

분획에서 순수하게 정제된 ASP가 확인되었다(그림 2의 화살표, 그림 3의 I).

2. 면역학적인 동정

분리 정제된 ASP의 정제순도를 확인하기 위해 면역학적인 동정을 행하였다(그림 4). 전혀 정제과정에서 거치지 않은 성충체액단백질의 항血清과 성충체액과는 다수의 沈降線이 형성되었으며(그림 4의 1) 정제된 ASP의 항血清과 성충체액과는 2개의 沈降線이 형성되었다(그림 4의 2). 그러나 분리 정제된 ASP의 항血清과 정제된 ASP와는 단 하나의 沈降線만이 검출되었다(그림 4의 3).

이상의 결과에서 gel 濾過 및 ion exchange chromatography에 의해 정제된 ASP는 면역학적으로도 순수하게 분리 정제되었음이 확인되었다. 그러나 정제된 항혈청과 성충체액 사이에 2개의 침강선이 형성된 사실은 뜻밖의 결과로서, 이것은 성충체액단백질 성분 가운데 ASP에 대한 공통항원기를 갖는 단백질이 2종 존재하고 있음을 시사하는 것으로서, 앞으로 ASP의 합성, 분비, 발육에 따른 消長 및 생리적 기능 등에 대한 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.



Fig. 4. Immuno-electrophoretic profile of adult haemolymph proteins (lane 1 and lane 2) and purified ASP (lane 3). Antiserum in lane 1 was prepared against adult haemolymph proteins, while that of lane 2 and lane 3 were prepared against purified ASP.

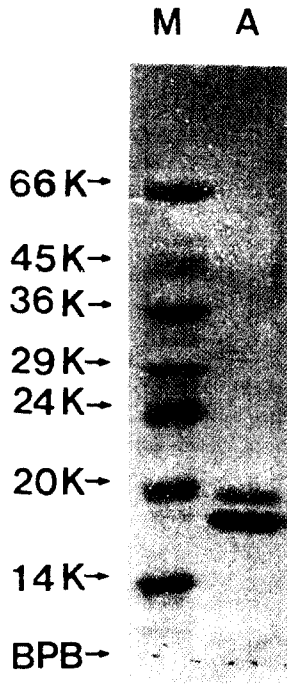


Fig. 5. SDS-PAGE of purified *Bombyx* ASP following gel filtration and ion exchange chromatography. Molecular weight of standards in dalton: 66 K, albumin bovine; 45 K, ovalbumin; 36 K, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrase; 29 K, carbonic anhydrase; 24 K, trypsinogen; 20 K, trypsin inhibitor; 14 K, α -lactalbumin. BPB, bromophenol blue; M, mark proteins; A, purified ASP.

3. ASP의 분자적 특성

ASP의 subunits 및 그 분자량에 대해 실험한 결과, ASP는 분자량 19.5 kDa 및 17.5 kDa으로 추정되는 2종류의 subunits로 구성되어 있음이 확인되었다(그림 5, 6). 이러한 결과는 ASP가 vitellin(Isumi *et al.*, 1980 b)의 heavy chain(180 kDa)과 light chain(42 kDa) 및 저장단백질(85 kDa : Tojo *et al.*, 1980) 보다 상당히 작은 분자량을 가지며 지금까지 저분자단백질로 알려진 30 KDa 단백질(Isumi *et al.*, 1981)보다도 더 작은 소분자단백질의 범주에 속하는 단백질로 구분될 수 있음을 알 수 있다.

PAS 염색 및 Sudan black B염색에 의한 분석결과, ASP는 糖 및 脂質분자를 포함하고 있지 않음이 확인되었다(그림 7). 그러므로 ASP는 糖 및 脂質분자를

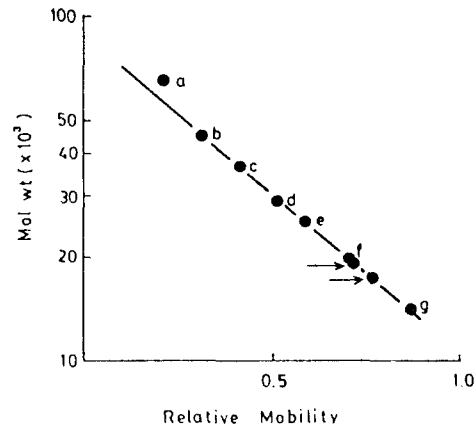


Fig. 6. Determination of molecular weight of purified *Bombyx* ASP subunits. Two arrows indicate two different subunits of ASP. Molecular weight of standards in dalton: a, albumin bovine (66 K); b, albumin egg (45 K); c, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 K); d, carbonic anhydrase (29 K); e, trypsinogen (24 K); f, trypsin inhibitor (20 K); g, α -lactalbumin (14 K). The mobility of each protein relative to that of tracking dye (BPB) in the presence of SDS was plotted against molecular weight.

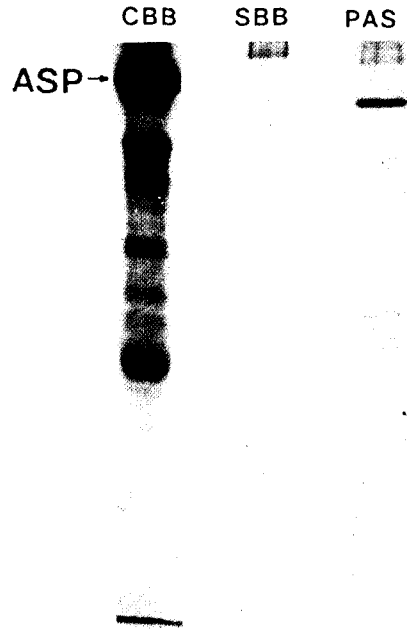


Fig. 7. Detection of sugars and lipids on ASP. The proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250 (CBB), with Sudan black B(SBB) for lipids and with PAS reagent (PAS) for carbohydrate. ASP, adult specific protein.

포함하고 있는 vitellin(Isumi *et al.*, 1980b), ESP(Irie and Yamashita, 1980), 30 kDa 단백질(Zhu *et al.*, 1986; Isumi *et al.*, 1981) 등과는 대조적인 분자적 특성을 갖는 單純蛋白質로 생각된다.

摘 要

누에의 성충특이체액단백질(adult specific protein : ASP)의 생리 생화학적 특성 및 성충화 발육에 따른 기능을 구명하기 위한 연구의 일환으로, ASP의 분리·정제 및 분자적 특성을 조사하였다. ASP는 Sephadex G-100 gel 여과 및 CM52 ion exchange chromatography에 의해 분리·정제되었으며, 정제된 단백질의 순도는 native-PAGE 및 면역전기영동에 의해 확인되었다. ASP는 분자량 19.5 kDa 및 17.5 kDa으로 추정되는 2종류의 subunits으로 구성되어 있고, 또한 糖 및 脂質을 포함하지 않는 단순단백질임이 밝혀졌다.

引 用 文 獻

- Chino, H.** (1985) Lipid transport: Biochemistry of hemolymph lipophorin. In "Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology", Vol. 10, (Eds G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), Pergamon Press, Oxford. pp. 115-135.
- Chino, H., S. Murakami, and K. Harashima** (1969) Diglyceride-carrying lipoprotein in insect hemolymph. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **176** : 1-26.
- Chino, H., S. Murakami, and K. Takahashi** (1976) Isolation and characterization of insect vitellogenin, its identity with hemolymph lipoprotein II. *Biochim. Biophys. Acta.* **441** : 349-353.
- Davis, B.J.** (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. In gel electrophoresis. by J.F. Fredrich. *Ann. New York Acad. Sci.* **121** : 404.
- Gamo, T.** (1978) Low molecular weight lipoproteins in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*: Inheritance, isolation and some properties. *Insect Biochem.* **8** : 457-470.
- Irie, K. and O. Yamashita** (1983) Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.* **13** : 71-80.
- Isumi, S., J. Fujie, S. Yamada and S. Tomino** (1981) Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* **670** : 222-229.
- 成洙一 · 文在裕 · 李相夢 · 尹馨珠** (1988) 鱗翅目 昆蟲의 成蟲體液蛋白質에 관한 生理生花學的 研究 I. 家蠶의 成蟲特異體液蛋白質의 檢出. *韓蠶學誌* **30**(1) : 20-24.
- Seong, S.I., K.E. Park, M. Nagata and N. Yoshitake** (1985) Effect of metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **2** : 91-104.
- Swahn, B.** (1953) Studies on blood lipids. *Scand. J. Clin & Lab. Invest. suppl.* **9**.
- Telfer, W.H., P.S. Keim and J.H. Law** (1983) Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: Comparison with calliphorin and manducin. *Insect Biochem.* **13** : 601-613.
- Tojo, S., T. Betchaku, V.J. Ziccardi and G.R. Wyatt** (1978) Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J. Cell. Biol.* **78** : 823-838.
- Weber, K. and M. Osborn** (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** : 4406-4412.
- Wyatt, G.R. and M.L. Pan** (1978) Insect plasma proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **47** : 779-817.
- Zacharius, R.M., I.L. Zell, J.H. Morrison and J.J. Woodlock** (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* **30** : 148-152.
- Zhu, J., L.S. Indrasith and O. Yamashita** (1986) Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx mori* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **882** : 427-436.