

## 누에의 후배자발생 초기에 있어서 돌연변이 불면잠계통간의 형질발현 특성

노시갑 · 선희숙 · 伴野 豊\*

경북대학교 농과대학, \*日本 九州大學

## Phenotypic Characterization of Non-molting Mutants in Post-embryonic Development of the Silkworm, *Bombyx mori*.

Si Kab Nho, Hee Sook Sun and Yutaka Banno\*

College of Agriculture, Kyungpook National University

\*Kyushu University, Japan

### ABSTRACT

Studies were carried out to investigate phenotypic expression, mortality and biochemical analysis of haemolymph proteins of *nm-d*, *nm-f*, *nm-i*, *nm-k* and *nm<sup>n</sup>* non-molting mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. The non-molting mutants characters were expressed in the homozygote of each mutant genes. All strains of non-molting mutants were similar with each other in physiological characteristics, but the expression varied with each strains. The larvae of *nm-d*, *nm-i* and *nm<sup>n</sup>* died between day 5 and day 9 after hatching without the first molt. The *nm-f* and *nm-k* mutants died between day 5 and day 16 with a slight increase of body weight and, more than 90% of the mutants larvae died before the first molt and a few of them survived to the 2nd and the 3rd instar and died. The haemolymph protein components of *nm-d*, *nm-i* and *nm<sup>n</sup>* were rapidly reduced, and on the other hand those of *nm-f* and *nm-k* consistently until they died. And there were no distinguishable difference in haemolymph components of non-molting mutants, as compared to those of normals.

Key words : Post-embryonic development, Non-molting mutant, Gene expression

### 서 론

대표적인 유전학 연구재료인 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 경우, 성충형질 관련 유전자가 집중적으로 밝혀져 있으며 난과 유충에 관련된 형질은 성충의 그것에 비해 월등히 적다(Ashburner, 1989). 그러나 집누에는 현재까지 밝혀진 450여 돌연변이 유전형질 중 상당부분이 난과 유충형질에 집중되어있다(盧, 1996). 이같은 관점에서 곤충발생 특히 후배자발생과정에 있어서 유전자의 형질발현기구에 관한 연구에는 누에가 최적의 연구재료라고 할 수 있다.

누에에는 현재까지 다수의 치사유전자가 알려져 있으나 이들 대부분은 전배자발생기에 치사작용이 나타나는 것들이며 후배자발생기인 유충기에 치사작용이 나타나는 유전자는 소수에 불과하다(土井良, 1984). 특히 초기유충기(약령기)에 치사작용을 나타내는 것으로서, 부화는 정상적으로 되지만 부화 후 2-3일째부터 발육이 지연되어 1주일정도 경과하여도 면에 들지 못하고 1령 유충상태로 있다가 폐사하는 소위 '불면잠(不眠蠶)'이라고 불리는 일군의 변이체들이 알려져 있다. 지금까지 보고된 불면잠계통으로는 1령 유충상태로 약 2주일 정도 생존하다가 폐사하는 *nm* 불면잠(梅谷唐澤, 1930), 피부가 투명하게 되면서 면에 들지 못하고 폐사하는 *nm-d* 불면잠(土井良, 1984), 즉시침산을 했을 때는 1령 유충인 채로 치사하지만 월년종일

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단 공모과제 연구비에 의해 수행되었음.

경우에는 최청사란으로 되는 *nm-m* 불면잠(清水 等, 1983), 일부 유충은 2령까지 발육하지만 2면에는 들지 못하고 폐사하는 *nm-g* 불면잠(清水, 1983) 등이 있다. 이밖에도 *nm-b* 불면잠(伴野 等, 1985a), *nm-k* 불면잠(伴野 等, 1985b), *nm-i* 불면잠(伴野 等, 1989) 등이 보고되어 있으며, 또한 *nm* 불면잠의 복대립유전자로 발견된 *nm'*(盧·上井良, 1991)과 비교적 최근에 발견된 *nm-f* 불면잠(盧 等, 1997) 등이 있다.

현재까지 보고된 불면잠계통에 대한 연구로서는 *nm* 불면잠의 탈피선을 관찰한 橫山(1936)의 조직학적 연구, *nm-g* 불면잠의 유충탈피와 관련된 내분비학적 연구(Nagata, 1987; 永田, 1992) 및 *nm'* 불면잠의 형질발현 해명(柳·盧, 1993) 등을 들 수 있는데, 이들 연구를 제외하고는 대부분이 유전학적 연구에 그치고 있는 실정이다. 이같은 사실은 불면잠에 대한 유전형질의 규명이나 형질발현기구등과 관련된 연구가 매우 미흡하다는 것을 단적으로 말하는 것으로, 불면잠 유전자들의 정확한 형질 및 발현양상에 대한 연구가 부족하다는 것이다.

본 연구는 현존하는(일부 불면잠계통은 소실됨) 불면잠 중에서 수종의 대표적인 불면잠계통에 대한 불면형질의 발현양상을 명확하게 하기 위하여 수행되었다. 또한 현재까지 곤충발육에 관한 연구의 대부분이 유충기 발생후기에 집중되어 있으며 후기발육로 연결되는 유충 초기발육기에 대해서는 활발한 연구가 이루어지지 못하였다. 이러한 관점에서 곤충 후배자발생 초기과정에 있어서 유전자에 의한 발육조절과 제어기구를 구명하기 위한 연구의 일환으로 누에 유충초기 치사돌연변이인 불면잠계통을 재료로하여 불면형질의 발현특성에 대한 해석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 불면잠계통의 확보 및 유지

공시 불면잠계통으로 *nm-d*, *nm-i*, *nm-k*, *nm'*(盧·上井良, 1991) 및 *nm-f*(盧 等, 1997) 불면잠계통을 사용하였다. *nm'*과 *nm-f* 불면잠계통은 경북대 천연섬유학과 곤충유전자원연구실에서 최초로 발견되었으며, 유전학적 연구와 함께 계통보존을 하고있는 것이다. 기타 불면잠계통은 일본 구주대학 유전자자원개발연구센터에 보존된 계통을 사용하였다.

본 연구에 사용된 불면잠은 모두 1개의 열성유전자에 의해 지배되는 것으로, 해당 불면잠유전자에 대해 homo접합체가 될 경우에만 불면형질이 나타난다. 각 계통의 homo접합체인 불면잠은 전부 치사되므로 통상 hetero접합체의 형태로 유지되는데, homo접합체가 발생된, 즉 불면잠이 발생한 아구의 정상개체를 상

호교배하면 다음 세대에 불면잠이 나올 수 있다. 본 연구에 사용된 공시재료는 이 때 발생된 동일 아구내의 불면잠과 정상잠을 사용하였다. 그러나 상호교배한 정상개체는 불면잠유전자가 hetero인 개체 상호간의 교배형과 정상잠 상호간의 교배형이 존재하므로(이 두 유전자는 표현형이 정상이므로 식별이 불가능하다) 동일 아구내에서 상호교배를 하더라도 불면잠이 발생하는 아구의 비율은 일정하지 않다. 따라서 분석에 필요한 충분한 수의 불면잠을 얻기 위해서는 계통당 적어도 1회 50-80아구 정도는 사육하여야 하므로 방대한 규모의 사육이 필요하였다. 사육은 항온사육실에서 표준사육법에 준하여 실시하였다.

### 2. 불면형질의 발현시기 및 양상

각각의 실험계통에 대해서 불면잠의 생존일수, 체중변화, 치사잠비율등을 조사하였다.

생존일수는 불면잠이 발생하여 폐사될 때까지의 일수로 측정하였고, 이에 따른 불면잠의 체중변화를 매일 일정한 시각에 50두씩 2반복 측정하였다. 치사잠비율은 불면잠이 발생한 날부터 매일 폐사되는 수를 조사하여 비율로 나타냈다.

*nm-f* 불면잠의 경우, 1령에서 3령까지의 정상잠과 불면잠의 두폭을 측정하였다. 각각의 유충을 10두씩 Carnoy액에 고정된 후 70% ethanol에 옮기고, 유충의 두부를 절단하여 slide-glass위에 놓고 실체현미경하에서 촬영하여 인화한 후 확대비율에 따라 실제길이를 환산하였다.

### 3. 체액단백질 분석

#### 1) 정량분석

각 불면잠계통의 유충으로부터 micro capillary를 이용하여 체액을 채취한 후 -40°C에 보관하였다가 분석에 사용하였다. 체액단백질의 농도는 체액 1 μl씩 5회 반복하여 측정하였으며, 측정은 Lowry의 방법을 응용한 여과지측정법(林, 1983)을 사용하였고, 흡광도는 Beckman DU650 (USA) 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 단백질농도는 미리 표준단백질로 만든 정량곡선을 이용하여 실제농도로 환산하였다.

#### 2) 정성분석

유충 체액단백질의 조성성분을 분석하기 위하여 Native 및 SDS-PAGE를 실시하였다. Native-PAGE는 Banno *et al.*, (1994)의 방법을 응용하여, 6.5% polyacrylamide gel를 지지체로 한 slab-gel 전기영동을 실시하였으며, SDS-PAGE는 Laemmli(1970)와 伴野 等(1993)의 방법에 준하여 10% polyacrylamide gel을 지지체로 한 불연속gel 전기영동을 실시하였다. 영동 후

0.1% C.B.B에 30분간 염색한 후, methanol, acetic acid계 용액으로 탈색하였다. 단백질 성분에 대한 densitometry는 Native 전기영동을 한 gel를 Kaiser(Vilber Lourmat) Image Analyzer (Germany)를 이용하였으며, 각 성분의 상대적인 농도를 계산하였다.

**결 과**

**1. 불면형질의 발현양상**

본 연구에 사용된 불면잠계통은 부화는 모두 정상적으로 이루어진다. 그러나 정상잠이 1면에 들어갈 즈음인 부화 후 3일경이 되어도 면에 들지않고 발육

이 지연되는 상태가 된다. 1령유충 상태로 발육이 정지되는 시기 즉 불면형질이 나타나는 시기가 계통에 따라 다르게 나타나는데, *nm<sup>r</sup>*의 경우는 부화 후 2일째부터, *nm-d*, *nm-i*, *nm-f*, *nm-k* 등은 부화 후 3일째부터 불면잠이 나타나기 시작한다. 그림 1의 a와 b는 *nm-i*와 *nm-d*불면잠의 사진으로서 불면잠의 크기나 형태가 두 계통간에 유사한 것을 알 수 있다. *nm<sup>r</sup>*(그림 1c)의 경우 타 계통에 비해 불면잠이 나타나는 시기가 빠르므로 정상잠과의 발육차이가 큰 것을 알 수 있으며, 또한 불면잠이 되면서 약한 유착성을 띄게 된다. 그림 1d는 *nm-k*불면잠으로, 불면잠의 크기에 상당한 변이가 있었다. 그림 2에 *nm-f*불면잠의 경과에 따른 발육상태를 나타냈다. 그림에 나타난 것과 같이 *nm-f*불면잠은 상당기간 생존하였으며 소수의 불면잠은 발육하여 령이 진전되었다. 그러나 유충의 크기는 정상잠과 비교하여 현저히 작았다. 이같은 현상은 *nm-k*불면잠에서도 유사하게 나타났다.

일반적으로 불면잠은 부화 후 일주일 정도 생존하

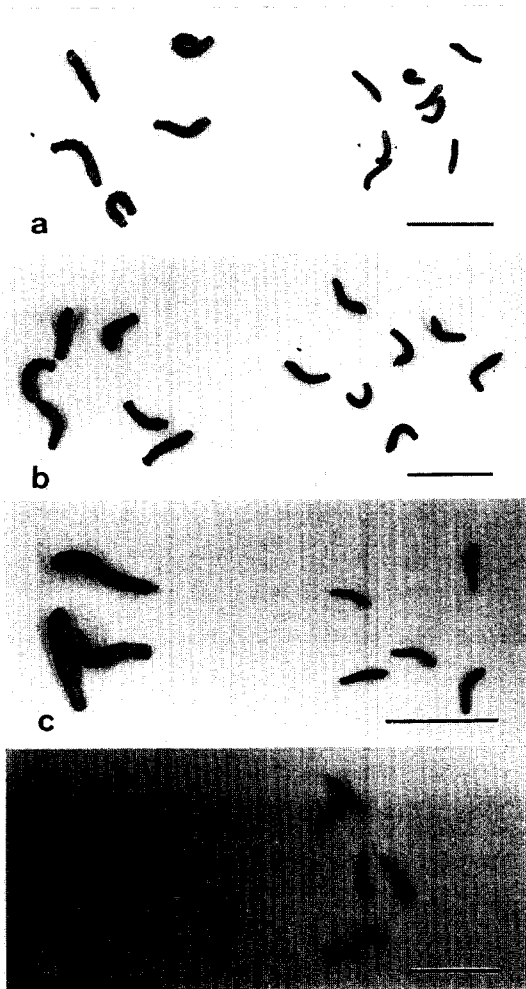


Fig. 1. Larvae of four non-molting mutants in 3 and 4 days after hatching. Normal is in left side, and mutant is in right side. a, *nm-i* strain ; b, *nm-d* strain ; c, *nm-k* strain ; d, *nm-k* strain. Scale bar, 10 mm.

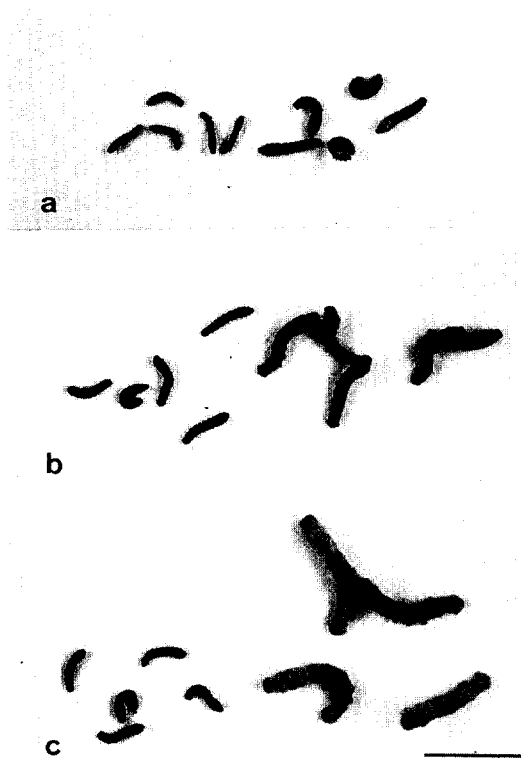


Fig. 2. Changes in larval growth of *nm-f* strain. Normal is in right side, and *nm-f* mutant is in left side. a, 3 days of the 1st instar ; b, 1 day of the 2nd instar ; c, 1 day of the 3rd instar. Scale bar, 10 mm.

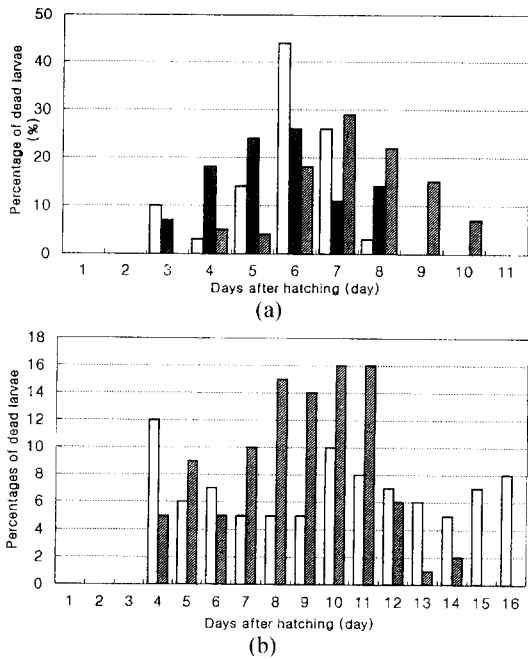


Fig. 3. a) Changes in ratio of dead larvae during early stages of larval development of non-molting mutants. □, *nm-n*; ■, *nm-d*; ▨, *nm-i*, b) □, *nm-k*; ▨, *nm-f* mutant

지만 계통에 따라서 15일 전후까지 생존하는 경우도 있었다. 따라서 실험에 사용한 계통들을 폐사되는 시기의 장단에 따라 두 그룹으로 나누었다. 그림 3a에 *nm-n*, *nm-d* 및 *nm-i* 불면잠계통의 발육경과에 따른 치사비율을 나타냈다. *nm-n*의 경우, 부화 후 3일째에 전

체 불면잠의 10%정도가 폐사되며 4일부터 급격히 증가하였고, 부화 후 6일째에 45% 정도가 폐사하였다. 따라서 *nm-n* 불면잠은 부화 후 6.7일경에 거의 대부분의 불면잠이 치사되는 것으로 나타났다. *nm-d*의 경우, 부화 후 4일째부터 폐사되기 시작하여 5일째에 18%, 6일째에는 24%로 증가하였으며 7일째에는 26% 정도로 최고치를 나타냈다. 부화 후 8일째에는 12%, 9일째에는 14%의 폐사율을 나타내면서 모두 치사되었다. *nm-i*의 경우, 부화 후 4, 5일째에 5%, 4%로 낮은 폐사율을 유지하다가 6일째에 18%, 7일째에 29%의 폐사율을 나타냈으며 8일째부터 22%, 15%, 7%로 매일 감소하였다.

한편 불면잠의 생존기간이 이들 3계통보다 다소 긴 *nm-f*와 *nm-k* 불면잠의 경우, 부화 후 4일째부터 폐사 잠이 발생하기 시작하였다(그림 3b). *nm-f* 불면잠은 4일째에 5%, 5일째에 9%, 6일째에 5%, 7일째에 10%로 나타났다. 이후 8, 9, 10일째에 각각 15%, 14%, 16%로 거의 일정한 폐사비율을 나타냈으며 12일째부터 감소하여 14일째에 대부분의 불면잠이 폐사되었다. *nm-k*의 경우, 부화 후 4일째에 12%의 폐사율을 나타내지만 5일째부터 9일째까지 6%, 7%, 5%, 5%, 5%이었으며 10일째에 10%로 최고치를 나타냈고, 11일째부터 16일째까지는 감소와 증가를 계속하였다.

표 1에 발육경과에 따른 불면잠의 체중변화를 나타냈다. *nm-n* 불면잠의 경우 부화 후 2일부터 정상잠과 차이가 나기 시작하였으며 부화 후 5일째(2령 1일)에는 정상잠이 13 mg 정도인데 비해 불면잠은 3 mg 전후로 나타났다. *nm-n* 불면잠은 치사될 때까지 극히 미량의 체중증가를 보이지만 정상잠의 1령 극대중에도

Table 1. Changes in body weight during early stages of larval development of non-molting mutants

(unit: mg/larva)

Strain	Day after hatching														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>nm-d</i>	normal	1.0	2.4	2.9	6.2	7.1	17.3	20.7	60.0	130.0					
	mutant	1.0	2.0	2.1	2.1	2.3	3.4	3.5	4.2	4.1					
<i>nm-f</i>	normal	1.0	2.5	4.1	4.5	8.9	21.7	24.5	40.0	96.0	160.0	165.0	360.0	760.0	900.0
	mutant	1.0	2.0	2.1	2.9	3.5	4.6	7.7	9.2	11.4	12.3	14.3	16.5	18.1	20.2
<i>nm-i</i>	normal	1.0	2.3	3.6	4.7	18.5	20.8	62.0	136.0						
	mutant	1.0	2.0	2.5	2.5	2.6	3.0	3.5	4.0						
<i>nm-k</i>	normal	1.0	3.2	3.5	6.9	14.7	18.4	33.5	77.0	113.0	115.0	222.0	352.0	522.0	542.0
	mutant	1.0	1.2	2.0	3.2	6.0	6.2	11.0	11.4	20.5	25.2	36.6	40.8	60.0	62.0
<i>nm-n</i>	normal	1.0	4.9	7.9	9.7	13.0	28.6	53.0	67.0						
	mutant	1.0	2.0	2.1	2.5	3.0	3.5	4.1	4.0						

미치지 못하였다. *nm-d*의 경우, 부화 후 3일까지는 거의 차이가 없다가 4일부터 정상잠에 비해 발육이 현저히 지연되면서 부화 후 9일까지 체중 변화는 거의 없이 2-4 mg의 수준에 머물다가 폐사되었다. *nm-i*의 경우에도 부화 후 3일부터 정상잠과 차이를 나타냈으며, *nm-d*불면잠과 유사한 경향이였다. *nm-f*불면잠은 부화 후 3일부터 정상잠과 차이가 나기 시작하였으며, 일부 유충에서는 미량의 체중 증가가 인정되었다. 부화 후 4일째에 3 mg, 7일째에 8 mg, 10일째에 12 mg, 14일째에 20 mg까지 증가하였다. *nm-k*불면잠도 이와 유사한 경향을 나타내었는데, 일부 불면잠은 최대 60 mg까지 증가하였으나 감소하다가 폐사되었다.

한편 *nm-f*와 *nm-k*의 일부 불면잠유충은 정상잠에 비해 발육은 현저히 지연되지만 탈피가 인정되는데 이같은 현상은 잠기에 따라 혹은 사육조건에 따라 다소 차이는 있었다. 령이 진전되는 불면잠의 발육경과를 보면 부화에서 1령탈피까지는 부화 후 6-7일이 걸렸으며, 2령 탈피는 부화 후 10-11일째(정상잠의 3령 3일경), 3령 탈피는 부화 후 14-16일째(정상잠의 4령 3-4일경) 등과 같이 령이 진전됨에 따라 발육은 더욱 지연되는 경향이였다. 또한 발생된 불면잠 중 약 85%정도가 1령 유충상태에서 폐사하였으며, 2령에서 11.3%, 3령에서 10.3%, 4령에서 0.9%, 5령에서 1.3%가 각각 폐사하였다(그림 4). 발육이 진전되어 탈피하는 불면잠은 체형이나 체중이 같은 시기의 정상잠에 비해 현저히 작고 가벼웠는데, 그림 5에 탈피한 *nm-f* 불면잠의 각령별 유충의 두폭을 나타냈다. 유충 두부의 폭을 비교하므로써 발육이 진전되는 불면잠의 크기를 간접적으로 알 수 있는데, 1령 유충기에는 동일하지만 2령 유충의 경우 정상잠의 약80% 수준에, 3령에서는 정상잠의 약 84% 수준에 머물렀다.

2. 유충발육과 체액단백질의 농도 및 조성의 변화

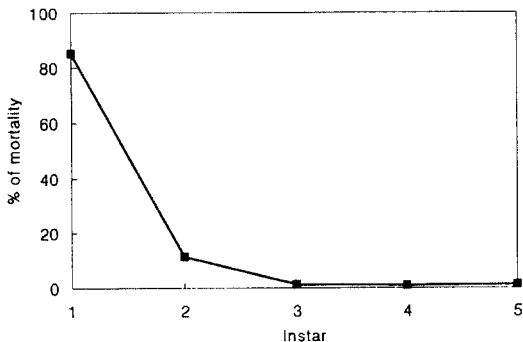


Fig. 4. Mortality of *nm-f* mutant in each instar.

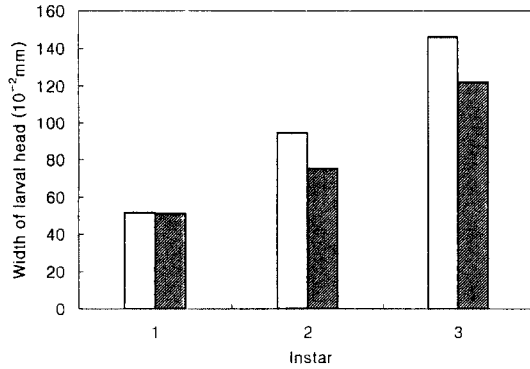


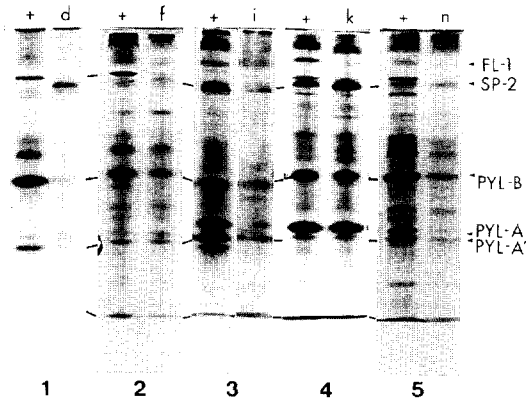
Fig. 5. Width of larval head in normal and *nm-f* mutant during early larval development. □, normal ; ▨, *nm-f* mutant

Table 2. Protein concentration of haemolymph in normal and non-molting mutant during larval development (unit: mg/ml)

Strains	Day after hatching			
	2	3	4	
(Day)				
<i>nm-d</i>	normal	5.6	7.2	5.8
	mutant	3.5	3.5	4.0
<i>nm-f</i>	normal	4.8	7.9	6.6
	mutant	3.5	5.2	6.7
<i>nm-i</i>	normal	7.2	11.8	8.5
	mutant	4.0	4.1	4.2
<i>nm-k</i>	normal	6.0	11.5	6.0
	mutant	7.0	12.3	6.0
<i>nm<sup>n</sup></i>	normal	4.9	6.0	6.6
	mutant	2.0	2.2	2.4

발육경과에 따른 유충 체액단백질의 양적 및 질적인 변화를 조사하기 위하여 부화 후 불면잠이 나타날 때부터 매일 일정한 시각에 유충 체액을 채취하였다. 채취한 체액의 일부는 체액단백질의 정량분석에, 일부는 전기영동에 의한 체액단백질의 성분분석에 사용하였다.

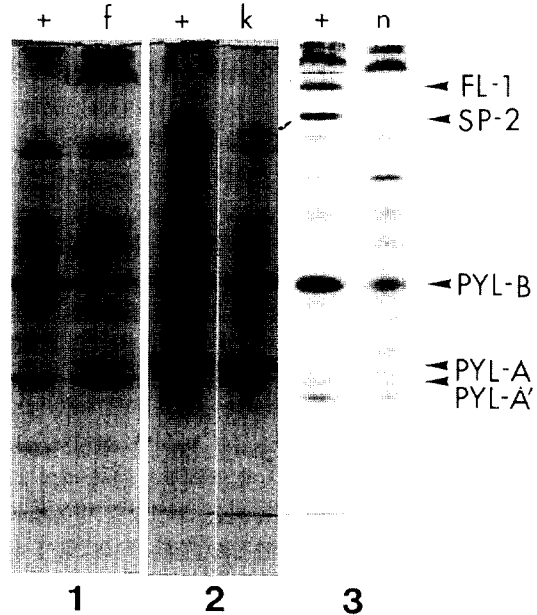
표 2에 부화 후 2, 3, 4일째의 유충 체액단백질의 농도변화를 나타냈다. *nm-d*계통의 부화 후 2-4일째의 체액단백질 농도변화를 보면, 정상잠은 부화 후 3일(1령 3일째)까지 증가하였다가 탈피 후인 4일째에 약간 감소하였다. 불면잠의 경우, 발육경과에 따른 체액단백질의 양적 차이는 미미하였으며 전체 단백질량에 있어서도 정상잠의 2/3정도에 불과하였다. *nm-i*와



**Fig. 6.** Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of haemolymph protein of non-molting mutants in 3 days of hatching. 1, *nm-d* strain; 2, *nm-f* strain; 3, *nm-i* strain; 4, *nm-k* strain; 5, *nm<sup>n</sup>* strain; FL-1, female larval protein 1; SP-2, storage protein 2; PYL-A and B, proteins of young larvae A and B.

*nm<sup>n</sup>*계통은 유사한 경향이었으며 정상잠과 불면잠간의 양적 차이는 더욱 컸다. *nm-f*계통의 정상잠은 부화 후 3일까지 농도가 증가하다가 탈피 후에는 감소하는 경향을 나타냈으며, 반면 불면잠은 부화 후 4일째에 최고치를 나타냈다. 표에는 나타나 있지 않지만 4일 이후 급격히 감소하였으며 6, 7일과 9, 10일째에 약간의 증가를 나타냈다. 불면잠의 경우 발육에 따라서 증가와 감소의 변화는 보이지만 단백질 농도는 정상잠에 비해 극히 낮았으며, 증감폭도 정상잠에 비해 적었다. *nm-k*계통의 경우, 정상잠과 불면잠이 거의 동일하게 증가와 감소를 나타냈다.

그림 6은 부화 후 3일째(1령 3일) 정상잠과 불면잠의 체액단백질 조성변화를 나타낸 것이다. 각 계통의 정상잠과 불면잠의 체액단백질을 전기영동으로 분석한 것으로, FL-1(Female larval protein 1), SP-2(Storage protein 2), PYL-A & B(Protein of young larvae A & B) 등의 주요성분과 함께 20여개의 미량성분이 검출되었다. *nm-d*계통의 경우, 정상잠은 주요성분 중에서 PYL-B가 가장 양이 많았으며 SP-2와 PYL-A가 주요성분으로 검출되었다. 불면잠에서는 SP-2가 정상잠보다는 적은 양이 검출되었으나 주요성분으로, 기타 성분은 모두 미량성분으로 검출되었다. *nm-f*계통의 정상잠은 *nm-d*의 정상잠과 거의 동일한 조성을 나타냈으며, 불면잠의 경우 전체적인 성분수에 있어서는 정상잠과 비슷하였다. PYL-B와 PYL-A'가 정상잠에 비해서 적은 양 검출되었으며 SP-2는 극소량 검출되었다. *nm-i*의 경우, 정상잠에서는 SP-2, PYL-B, PYL-A 및 PYL-A'이 주요성분으로 검출되었다. 불면잠은



**Fig. 7.** Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of haemolymph protein of non-molting mutants in 5 days of hatching(the 1st day of the 2nd instar). 1, *nm-f* strain; 2, *nm-k* strain; 3, *nm<sup>n</sup>* strain. Symbols are the same as Fig. 6.

SP-2, PYL-B, PYL-A'를 제외한 거의 대부분이 미량성분으로 검출되었다. *nm-k*계통의 정상잠은 FL-1, SP-2, PYL-B, PYL-A성분이 주요성분으로 검출되었으며, 불면잠에서는 FL-1성분이 미량으로 검출된 것을 제외하고는 대부분의 성분이 정상잠과 동일하게 나타났다. *nm<sup>n</sup>*의 경우 PYL-B가 정상잠에서 가장 큰 성분으로 나타났으며, 불면잠의 경우 거의 모든 성분이 미량성분으로 검출되었다. 그림 7은 부화 후 5일 이후에도 발육을 계속하는 불면잠계통 중에서 *nm-f*, *nm-k* 및 *nm<sup>n</sup>*계통의 부화 후 5일째 유충 체액단백질의 전기영동상을 나타낸 것이다. *nm-f*불면잠의 경우 검출된 성분수는 정상잠과 동일하였으나 양적으로 정상잠의 그것에 비해 극히 적었다. *nm-k*불면잠의 경우, PYL-B, PYL-A성분은 정상잠과 거의 동일하게 검출되었으며 SP-2성분은 미량성분으로 검출되었다. *nm<sup>n</sup>*불면잠을 보면, 정상잠에서는 FL-1, SP-2, PYL-B등이 주요성분으로 검출된 반면 불면잠에서는 PYL-B를 제외하고는 거의 모든 성분이 극미량 검출되었다.

이상 불면잠계통의 체액단백질에 대한 전기영동상을 비교분석한 결과, 각각의 불면잠계통의 정상잠은 계통 고유의 전기영동pattern를 나타냈으며, 정상잠과 불면잠과의 사이에서는 성분에 따라서 양적 혹은 질

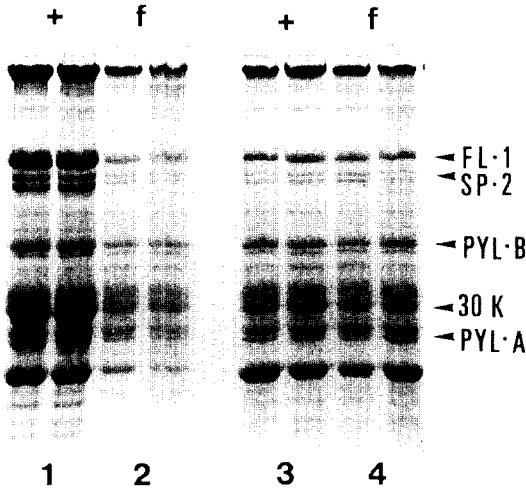


Fig. 8. SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of haemolymph protein of the *nm-f* strain. 1 and 2 lane, 3 days after hatching; 3 and 4 lane, 5 days after hatching. Symbols are the same as in Fig. 6.

Table 3. Changes in the ratio of the 4 major protein components to total haemolymph protein concentration in 5 non-molting mutants on 3 days of first instar

Strains	4 major protein components(%)				
	FL-1	SP-2	PYL-B	PYL-A'	
<i>nm-d</i>	normal	32	47	93	85
	mutant	30	45	26	48
<i>nm-f</i>	normal	13	27	77	50
	mutant	8	4	45	29
<i>nm-i</i>	normal	30	65	52	48
	mutant	8	12	10	11
<i>nm-k</i>	normal	25	40	59	56
	mutant	6	55	52	55
<i>nm<sup>n</sup></i>	normal	18	19	95	33
	mutant	0	0	19	3

적 차이가 있는 것도 있었다. Native gel 전기영동에서 나타난 이같은 사실들을 확인하기 위하여 체액단백질의 구성 분자종에 대한 분석을 실시하였다. 즉 체액단백질에 대한 SDS-PAGE를 실시하였는데, 재료로 사용한 *nm-f* 불면잠은 유충 발육이 다소 진전되다가 폐사되는 계통이므로 경과에 따른 체액단백질의 분자종을 분석하는데 적합할 것으로 판단되어 이 계통을 사용하였다. 그림 8에 *nm-f* 계통의 체액단백질을 SDS-PAGE로 분석한 것을 나타냈다. 부화 후 3일(1령 3일째)에는 FL-1, SP-2, PYL 등의 성분을 포함한

거의 모든 성분이 정상잠에 비해 미량으로 검출되었으며 단백질 성분에 있어서의 질적인 차이는 인정할 수 없었다. 부화 후 5일(2령 1일) 유충에서도 정상잠과 불면잠에서 성분의 질적 차이는 인정할 수 없었다.

표 3에 부화 후 3일째 각 불면잠계통의 체액단백질 전기영동상에 나타난 주요성분들을 densitometry하여 각 성분의 농도를 상대 비율로 나타냈다. *nm-d* 불면잠의 경우 FL-1과 SP-2 성분은 정상잠과 유사하였으나 PYL 성분에 있어서는 정상잠의 약 1/2 정도의 농도를 나타냈다. *nm-f* 불면잠을 보면, 4가지 주요성분 모두에서 정상잠에 비해 상당히 낮은 비율로 존재하였다. *nm-i*와 *nm<sup>n</sup>* 계통의 경우, 불면잠에서 FL-1과 SP-2 성분은 존재하지 않을 정도로 그 비율이 낮았다. *nm-k* 계통 불면잠의 경우, FL-1 성분을 제외하고는 정상잠과 거의 같은 비율을 나타냈다.

## 고 찰

현재까지 곤충의 성장·발육에 대한 연구의 대부분은 전배자발생기(난형성기 포함)와 후배자발생 후기에 집중되어 있으며 후배자발생 초기에 대해서는 활발한 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 그러나 후배자발생 초기과정 즉 유충의 초기 발육과정은 전배자발생과 유충기 후기 발육 및 성충기 발육으로 이어지는 중요한 과정으로서 생리적 의의는 매우 크다고 하겠다.

본 연구는 누에 유충기 초기에 발생이상을 나타내는 치사돌연변이체인 불면잠계통의 형질특성을 규명한 것으로, 실험재료인 불면잠계통에 대해서는 현재까지 10여종이 유전적으로 확인되었지만 각 유전형질에 대한 발현양상이나 기구에 대한 연구는 거의 전무한 상태이었다. 또한 사용된 불면잠계통 중의 일부는 국내에서 처음으로 발견된 돌연변이체들로서 본 연구의 의의를 더하는 것으로 생각된다.

현재까지 대부분의 불면잠은 부화 후 일주일 정도 생존하다가 면에 들지 못하고 폐사하는 것으로만 알려져 있었으나 계통(유전자)에 따라 다소 차이가 있다는 사실이 밝혀졌다. *nm<sup>n</sup>*과 *nm-d*의 경우에는 부화 후 8일 정도까지, *nm-i*의 경우에는 부화 후 10일 정도까지 생존하였다. *nm-f*의 경우에는 부화 후 14일 정도까지 생존하였으며, *nm-k*의 경우에는 14일 이상 생존하는 개체도 다수 존재하였다. 불면잠이 나타나는 시기는 *nm-d*, *nm<sup>n</sup>* 불면잠이 부화 후 3일째부터, *nm-f*, *nm-i*, *nm-k* 불면잠이 부화 후 4일째부터 나타나기 시작하였다. 또한 불면잠이 폐사되는 경향을 보면 *nm-k*를 제외하고는 정규분포곡선의 양상을 나타내는데 비

해 *nm-k* 불면잠의 경우에는 일정한 경향이 없었다. 이상과 같은 사실로부터 불면잠은 계통에 따라서 형질이 발현되는 양상이 매우 상이하다는 것을 알 수 있다. 또한 *nm-k*와 *nm-f* 불면잠의 경우(그림 4, 5) 2, 3, 4령까지 령이 진전되는 개체도 상당수 존재하였는데 이같은 사실들이 이를 더욱 뒷받침하는 것으로 생각된다. 발생한 불면잠의 발육경과에 따른 체중변화를 살펴보면 *nm-d*, *nm-i*, *nm'* 불면잠계통과 *nm-f*, *nm-k* 불면잠계통이 상이한 것으로 나타났다. 이는 불면잠의 발생양상이나 생존일수와도 밀접한 관계가 있는 것으로 생존일수가 짧을수록 체중은 거의 변화하지 않았고 생존일수가 길수록 체중도 조금씩 증가하는 것으로 나타났다.

한편 *nm-f*의 경우 일부 불면잠은 탈피하여 2, 3령으로 진전되었는데, 탈피한 유충의 두부크기를 비교해 보면 정상잠에 비해 월등히 작고 또한 각 령의 기간도 정상잠에 비해 거의 2배에 가깝게 지연되는 것으로 나타났다. 이같은 사실은 *nm-k* 불면잠에서도 유사하게 나타나는 현상으로 불면잠유전자의 형질특성을 나타내는 것으로 생각된다. 그러나 이같은 현상은 잠기나 사육조건에 따라 변이가 있을 수 있고, 소수의 개체는 5령까지도 발육하지만 용화는 하지 못한 점등으로 볼 때 이들 유전자들도 유충초기에 한정적으로 발현되는 것으로 생각된다.

발육경과에 따른 불면잠의 체액단백질 농도는 *nm-d*, *nm-i*, *nm'* 불면잠에서는 거의 일정한 상태이었고, *nm-f*와 *nm-k* 불면잠은 발육경과에 따라 변화가 있었다. 특히 *nm-k*의 경우는 정상잠과 거의 같은 수준이었으며, *nm-f*는 정상잠에 비해 상당히 낮은 수준이었지만 정상잠과 유사한 증감현상을 나타냈다. 이같은 현상은 전술한 불면잠의 생존일수나 체중변화에서 나타난 결과와도 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되는데, 불면잠일지라도 생존일수가 길어질 경우 혹은 탈피하여 령이 진전될 경우에는 체액단백질도 지속적으로 합성 분비되는 것으로 판단된다.

그림 6, 7, 8에 나타난 정상잠의 체액단백질 조성을 보면 *nm-d*, *nm-f* 및 *nm'* 계통이 유사하며 *nm-i*와 *nm-k* 계통이 유사한 것으로 나타났다. 그러나 실험에 사용한 불면잠계통의 전기영동pattern이 완전히 일치하는 것은 아니며, 따라서 각각의 불면잠계통은 계통 고유의 영동pattern을 가지는 것을 알 수 있다. 또한 *nm-k* 불면잠을 제외한 모든 불면잠계통에서는 주요성분과 함께 거의 대부분의 성분이 양적으로 상당히 감소된 상태이었다. 1993년 伴野 등은 누에 유충기초기에 특이적으로 나타나는 약령형단백질(Pyl)의 존재에 대해서 보고하였는데, 이 단백질은 누에의 1-3령기 사이에

존재하다가 종령기에는 소실되는 것으로 치잠기발육에 중요한 작용을 할 것으로 생각되는 성분이다. 불면잠계통은 주로 1령에서 거의 대부분의 불면형질이 나타나므로 유충초기발육과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되는 약령형단백질(Pyl)과의 관계를 생각할 수 있다. *nm-k* 불면잠을 제외한 대부분의 불면잠계통에서 Pyl 성분은 정상잠에 비해 크게 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 불면잠의 경우 거의 대부분의 단백질성분이 감소되는 것으로부터 불면형질의 발현과 Pyl 성분과는 직접적인 관계는 없는 것으로 사료된다. 특히 *nm-f*를 대상으로 한 SDS-PAGE의 결과등을 종합해 볼 때 불면잠에서만 특이적으로 검출되는 단백질 성분은 인정할 수 없었으며, 계통에 따라 감소되는 성분의 종류도 다소 다르게 나타나므로서 불면잠에서만 특이적인 변화를 하는 단백질 성분도 인정할 수 없었다. 불면잠계통에 대한 체액단백질의 정량분석과 전기영동에 의한 정성분석의 결과, 모든 불면잠에서 공통적으로 나타나는 특정성분의 체액단백질이나 경과에 따라 일정한 변이를 하는 성분등은 인정할 수 없었다. 따라서 현 시점에서 불면형질의 발현과 관련된 어떤 특이적인 체액단백질 성분도 불면잠계통 내에 공통적으로 존재하지는 않는 것으로 사료된다.

이상 본 실험에 사용한 불면잠계통에 대한 생리생태학적 및 생화학분석 결과를 종합하면 이들 불면잠계통을 크게 두가지 유형으로 구분할 수 있을 것으로 생각된다. 즉 치사시기가 빠르고 체액단백질성분의 대부분이 소실되는 퇴화형 불면잠계통과 생존기간이 비교적 길며 체액단백질성분이 미량감소 혹은 유지되는 치잠기 유지형 불면잠계통이 그것이다. 퇴화형 불면잠계통으로는 *nm-d*, *nm-i*, *nm'*이 속하며, 치잠기 유지형계통으로는 *nm-f* 및 *nm-k*가 속한다고 하겠다. 이와같은 결론에 의해 향후 불면잠계통을 이용한 곤충 후배자발생 초기과정의 유전자발현기구에 대한 연구는 각 계통의 특성을 고려한 적절한 재료의 선택이 중요할 것으로 사료된다.

## 적 요

곤충 후배자발생과정(약령기)에 있어서 유전자의 형질발현기구를 구명하기 위한 연구의 일환으로, 누에의 유전적 돌연변이 불면잠계통을 재료로 하여 실험을 실시하였다. *nm-d*, *nm-f*, *nm-k*, *nm-i*, *nm'* 등의 5개 불면잠계통에 대한 불면잠의 발현양상, 생존일수, 치사율, 체액단백질의 농도 및 조성 등을 조사한 결과, 불면잠계통들은 대체로 유사한 형질발현을 하였으나 각 계통들의 유전자특유의 형질특성은 인정



되었다. 이들 특성을 기초로하여 불면잠계통을 두가지 유형으로 구분할 수 있었다. 즉 치사시기가 빠르고 체액단백질성분의 대부분이 소실되는 약령기퇴화형 불면잠과 생존기간이 비교적 길며 체액단백질성분의 감소가 비교적 적은 약령기유지형 불면잠으로 그 특성이 구분되었다.

## 참고문헌

- Ashburner, M.(1989) *Drosophila*; A laboratory handbook. Cold Spring Harbor. New York.
- 伴野 豊·河口 豊·土井良 宏(1985a) N-메틸-N-니트로소우레아誘發突然變異,b不眠蠶 の遺傳學的研究. 日蠶雜 54, 227-231.
- 伴野 豊·河口 豊·土井良 宏(1985b) k不眠蠶遺傳子の座位. 九州蠶絲 19, 55.
- 伴野 豊·河口 豊·石河 正久·土井良 宏(1989) 카이코의第26聯關群, 媒蠶-石河不眠蠶. 日蠶雜 58, 234-239.
- 伴野 豊·原 眞二·河口 豊·土井良 宏(1993) 카이코幼蟲期の體液タンパク質의變動と若齡型タンパク質의存在. 日蠶雜 62, 187-194.
- Banno, Y., Noda, K. and Y. Kawaguchi(1994) Linkage studies on a hemolymph protein named 'Protein of young larvae A-4(PYL-4)' of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 63, 299-302.
- 土井良 宏·木原 始·伴野 豊(1984) 矮小不眠蠶의遺傳學的研究. 日蠶雜 53, 427-431.
- 土井良 宏(1992) 家蠶遺傳子資源系統의特性情報. 九州大學 遺傳子資源研究センター.
- 林 博司(1983) 濾紙を用いたfolin法の簡便化. 生化學 55, 257-258.
- Laemmli, U. K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Nagata, M., Tsuchida, M., Shimizu, K., and N. Yoshitake(1987) Physiological aspects of nm-g mutant: An ecdysteroid-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 33, 723-727.
- 永田 昌男·土田 耕三·折笠千登世·鈴木 昭憲(1992) 光澤不眠蠶의엑ジ스테ロイド分 泌系について. 日蠶雜 61, 400-406.
- 盧時甲(1996) 家蠶 遺傳子資源 및 遺傳形質. 韓蠶學誌 38, 57-72.
- 盧時甲·土井良 宏(1991) 새로운 突然變異 不眠蠶의遺傳學的研究. 韓蠶學誌 33, 72-74.
- 盧時甲·宣姬淑·伴野 豊(1997) 新突然變異 遺傳子nm-f의 遺傳子座位와 聯關群 檢索. 韓國蠶絲學會春季學術發表要旨.
- 柳賢珠·盧時甲(1993) 突然變異 不眠蠶(nm\*)의 不眠形質의 發現. 韓蠶學誌 35, 93-99.
- 清水久仁光(1983) 新突然變異, 光澤不眠蠶의遺傳. 日蠶雜第53回講要, 64.
- 清水久仁光·島 守利·藤卷 忠彦·藤森 胡友·松野道雄(1983) 新突然變異'松野不眠 蠶'의遺傳. 日蠶雜 52, 348-353.
- 梅谷與七郎·唐澤 侑衛(1930) 發育抑制因子を有する家蠶について. 遺傳學雜誌 6, 188-194.
- 橫山 忠雄(1936) 遺傳的不眠蠶의組織學的觀察. 日蠶雜 7, 96-106.