

곤충혈림프에 존재하는 리포포린의 기능

정은숙, 조준호, 윤화경
한서대학교 생명과학과
kyung813@hanseo.ac.kr

The Functions of Lipophorin in Insect Hemolymph

Eun-Suk Jung*, Jun-Ho Joe, Hwa-Kyung Yun**
Department of Biological Sciences, Hanseo University

요 약

곤충 혈림프에서 존재하는 리포포린은 선택적으로 지질을 지질 사용 및 저장기관으로 운반한다. 본 연구는 유충지방체, 성충난소 및 정소로 지질의 운반과 유충지방체 및 성충난소로 리포포린 자체가 흡수되는 과정을 조사하였다. 이들의 기능을 조사하기 위해 FITC-labeled 리포포린과 DiI-labeled 리포포린을 사용하였다. 유충지방체, 성충난소 및 정소를 DiI-labeled 리포포린과 배양한 결과 리포포린으로부터 각 기관으로 지질을 운반함을 알 수 있었고, 또한 receptor-mediated endocytosis 억제제인 suramin, unlabeled 리포포린과 배양한 결과는 리포포린에서 각 기관으로 운반되는 지질의 양이 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 또한, 유충지방체와 성충난소를 FITC-labeled 리포포린과 배양한 결과 위에서 언급한 지질 뿐만 아니라 리포포린 자체도 각 기관의 에너지원으로 사용하기 위해 흡수된다는 사실을 알 수 있었으며, suramin과 unlabeled 리포포린과 배양한 결과 리포포린 자체가 흡수되는 양이 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 위 실험결과로부터 리포포린에 의한 지질의 운반과정과 리포포린 자체의 흡수과정이 receptor-mediated endocytosis로 이루어짐을 알 수 있었다.

1. 서론

리포포린은 지질을 fat body에서 ovary, testis 그리고 flight muscle과 같은 이용기관으로 운반한다 [1-3]. 리포포린은 주요 지질인 DAG 뿐만 아니라 hydrocarbon, phospholipid 그리고 cholesterol도 운반한다[4,5]. 리포포린은 apolipophorin-I (240Kd)과 apolipophorin-II (70Kd)으로 구성 되어 있다[6,7]. 본 연구에서는 유충지방체, 성충난소 및 정소와 FITC-labeled 리포포린, DiI-labeled 리포포린을 incubation하여 형광 현미경으로 지질의 운반과정과 리포포린의 흡수과정을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 Insect

꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*) 유충은 인공사료를 사용하여[8], 온도 30°C±2, 습도 60±5%에서 12

시간 dark/light 하여 사육하였다.

2.2 Fat Body, Ovary, Testis 분리

혈림프는 larval에서 얻어 HEPES buffer(10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, pH7.0)에 melanization을 막기 위해 phenylthiourea (PTU)을 포함하여 -70°C에 보관하고, 지방체는 유충으로부터 해부하여 조직배양에 사용하였고, 난소와 정소는 성충으로부터 해부하여 조직배양에 사용하였다.

2.3 리포포린 정제

리포포린은 44.5% KBr 밀도구배로 하여 SW41-Ti rotor(Beckman)로 39,000rpm, 4°C, 16시간동안 초원심분리 한 다음, 노란색띠를 pastur pipet으로 collect 한다. 0.01M HEPES buffer를 사용하여

dialysis하고 Sephadex G-200(Phamacia, LKB, Uppsala, Sweden)column으로 리포포린을 fraction collect한다.

2.4 FITC-labeled 리포포린과 DiI-labeled 리포포린의 제조

리포포린 1ml을 100mM sodium bicarbonate 1ℓ에 dialysis를 하고, DMSO(Dimethyl sulfoxide) 1ml에 FITC 10mg을 넣어 FITC를 만든다. Dialysis한 리포포린 1ml에 FITC 10mg/ml의 100μℓ을 넣고 호일로 싸서 상온에서 4시간 incubation 하고 Ethanolamine 100μℓ을 넣고 2시간 incubation해서 FITC-labeled Lp를 제조한다.

DiI-Lp는 DMSO 1ml에 DiI(Molecular Probe) 0.1mg을 넣고 0.1mg/ml을 만들어 incubation 한다. FITC-labeled 리포포린과 DiI-labeled 리포포린을 Sephadex G-25 PD-10 column(Amersham Phamacia Biotech.)으로 정제한다.

2.5 Fat Body, Ovary, Testis와 FITC-Lp, DiI-Lp의 incubation

12-well multidish의 각 well에 FITC-Lp 100μℓ, FITC-Lp 200μℓ와 Lp 200μℓ의 혼합액, FITC-Lp 200μℓ와 suramin 200μℓ을 혼합액을 넣은 다음의 well에 같은 무게의 Fat Body를 넣어 1시간동안 incubation 한다. 지방체 배양과 마찬가지로 Ovary와 Testis도 incubation 한다. (DiI 형광물질은 FITC-Lp대신 DiI-Lp를 넣고 같은 방법으로 incubation 한다.)

2.6 Microscopy

Slide glass에 올려놓고 whole mount방법으로 Fluorescence Axioskop microscope(Zeiss)로 관찰하고. AxioCam HRc digital camera로 촬영하고 AxioVision Release 4.5 software(Zwiss)를 사용하였다.

3. 결과 및 결론

리포포린은 240Kd의 apoLp- I 과 70Kd의 apoLp-II으로 구성되어 있다. 리포포린 수용체가 지방체와 난소에 존재하여 HDLp를 흡수한다는 사실이 알려져 있는데[9-11], 본 연구에서도 FITC-labeled 리포포린을 유충지방체와 성충난소와 배양한 결과 지방체(Fig.1 A)와 성충난소(Fig.2 A)에 리포포린이 흡

수되는 것을 알 수 있었고, 흡수되는 과정을 조사하기 위하여 unlabeled 리포포린과 endocytosis inhibitor인 suramin을 처리한 결과 상당한 양의 리포포린 흡수가 감소됨을 알 수 있었다(Fig.1,B,C와 Fig.2 B,C). 또한, 유충지방체, 성충난소 및 성충정소와 DiI-labeled 리포포린과 배양한 결과 리포포린이 지질을 운반한다는 사실을 알 수 있었으며(Fig.3A, Fig.4A와 Fig.5A), 또한 유충지방체(Fig.3,B,C), 성충난소(Fig.4, B,C)와 성충정소(Fig.5, B,C)에 suramin과 unlabeled 리포포린과 경쟁을 시킨 결과 지질운반이 현저하게 감소되는 것을 볼 수 있었다. 위의 실험결과로부터 리포포린에 의한 지질의 운반과 리포포린 자체의 흡수과정이 receptor-mediated endocytosis 라는 결과를 얻었다. 또한, 본 연구에서 정소로 지질을 운반하는 과정은 처음 얻어낸 결과이다.

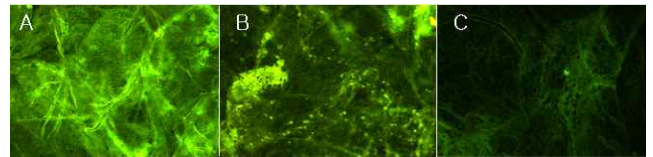


Fig.1 Visualization of FITC-Lp in *G. mellonella* fat body tissues. Fat body tissues incubated FITC-Lp (A), FITC-Lp with unlabeled Lp (B) and FITC-Lp with suramin(C).



Fig. 2 Visualization of FITC-Lp in *G. mellonella* ovary tissues. Ovary tissues incubated FITC-Lp (A), FITC-Lp with unlabeled Lp (B), and FITC-Lp with suramin(C).

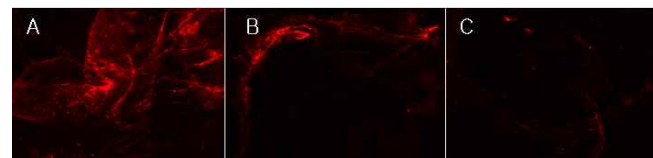


Fig. 3 Visualization of DiI-Lp in *G. mellonella* fat body tissues. Fat body tissues incubated DiI-Lp (A), DiI-Lp with unlabeled Lp (B), and DiI-Lp with suramin(C).

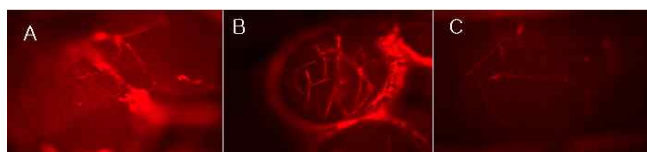


Fig.4 Visualization of DiI-Lp in *G. mellonella* ovary tissues. Ovary tissue incubated DiI-Lp (A), DiI-Lp with unlabeled Lp (B), and DiI-Lp with suramin(C).



Fig.5 Visualization of DiI-Lp in *G. mellonella* testes tissues. Testes tissues incubated DiI-Lp (A), DiI-Lp with unlabeled Lp (B), and DiI-Lp with suramin(C).

5. 참고문헌

- [1] Yun, H. K., W. K. Kim, and H. R. Kim, 1994. Immunological analysis of lipophorin in the hemolymph, ovaries, and testes of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **27**: 153-167.
- [2] Jouni, Z.E., N. Takada, J. Gazard, H. Maekawa, M. A. Wells, and K. Tsuchida, 2003. Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* oocytes in vitro: role of the lipid transfer particle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 145-153.
- [3] Jung, E.S., J.H.Joe, and H.K.Yun, 2006. Lipophorin uptake by the larva fat body and adult ovary in the wax moth *Galleria mellonella*. *Entomol. Res.* **36**: 167-171.
- [4] Soulages, J. L., and M. A. Wells, 1994. Lipophorin: the structure of an insect lipophorin and its role in lipid transport in insects. *Advances in Protein Chemistry.* **45**: 371-415.
- [5] Jouni, Z.E., H.K. Yun, and M. A. Wells, 2002. Cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body in vitro: high-density lipophorin as the receptor. *J. insect Physiol.* **48**: 609-618.
- [6] Yun, H. K., and H. R. Kim, 1993. Characterization of lipophorin from hemolymph of Fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury). *Kor. J. Entomol.* **36**: 231-237.
- [7] Yun, H. K., C. H. Park, and H. R. Kim, 1996. Characterization and Biosynthesis of Lipophorin in *Hyphantria cunea*. *Kor. J. Entomol.* **26**: 385-392.
- [8] Han, J., C.S.Lee, and C.Y.Yun, 2003. Cloning and expression of male-specific protein(MSP) from the hemolymph of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. *Arch. of Insect Biochem. and Physiol.* **54**: 110-120.
- [9] Kawooya, J.K., E.O. Osir, and J.H. Law, 1988. Uptake the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *J. of Biol. Chem.* **263** : 8740-8747.
- [10] Van Hoof, D., K. W. Rodenburg, and D. J. Van der Horst, 2005. Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoprotein and transferrin in insect cells, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**: 117-128.
- [11] Atella, G.C., M.A.C. Silva-Neto, D.M.Golodne, S.Arefin, and M.Shahabuddin, 2006. *Anepholes gambiae* lipophorin : Characterization and role in lipid transport to developing oocyte. *Insect Biochem. and Mole. Biol.* **36** : 375-386.