

## 家蠶의 中腸變態에 關한 內分泌學的 研究

成 洙 一

水原大學 遺傳工學科

### An Endocrinological Study on Metamorphosis of the Midgut in Silkworm, *Bombyx mori*

Su Il Seong

Department of Genetic Engineering, Suwon University

#### SUMMARY

In order to investigate an endocrinological effect on metamorphosis of the midgut in silkworm, *Bombyx mori*, 20-hydroxyecdysone and crude extract of brain (PTTH) were injected into pupal isolated abdomens, devoid of prothoracic glands and also in the brainless diapausing pupae with the prothoracic glands (so-called dauer pupae).

When ecdysone was assayed abdomens, drastic morphological changes occurred in the midgut. The wet weights of midguts were found decrease as like the normal pupae at metamorphosis. Proteineous changes in epithelial midgut were also observed; pupal specific proteins (PSP) vanished while the adult proteins were newly synthesized. Similar results were also found in the changes of protein in the midgut of dauer pupae by injecting ecdysone and PTTH.

#### 緒 論

昆蟲의 脫皮 및 變態는 ecdysone에 의해 誘導되고 (Fukuda, 1944), 이 ecdysone은 뇌하수체(PH)에 의해 活性化된 前胸腺에서 分泌되고 있음이 밝혀졌다 (Williams, 1946). 變態기에 있어서의 ecdysone은 각종 成蟲原基의 分化 및 發育을 促進하는 한편, 幼蟲組織의 全面的인 붕괴 혹은 部分的인 更新에도 關係하고 있다(藤條·鎮西 1977).

이와같은 變態時의 形態의 變化와 함께 각종 物質 즉 단백질, 핵산 酵素등의 合成이 ecdysone에 의해 促進되고 있음이 밝혀지고 있다(大瀧·櫻井, 1975) 특히 變態時의 各種 成蟲原基에서의 단백질 合成이 ecdysone에 의해 촉진되고 있음이 放射性同位元素를 利用한 in vitro실험에 의해 證明되었다. (Kuniyuki·Fristrom, 1977; Oberlander, 1976; Oberlander·Leach, 1978; Siegel·Fristrom, 1974). 특히 Siegel·Fristrom(1974)과

Oberlander(1976)는 ecdysone에 의해 合成이 유도되는 特異한 단백질成分을 檢出하였다. 그러나 ecdysone에 의한 變態期の 蛋白質에 관한 연구는 주로 成蟲原基에 集中되어있고 中腸消化管에 關해서는 아직 報告되지 않고 있다.

한편 ecdysone을 哺乳動物의 Steroid호르몬과 比較할때 가장 뚜렷한 差異點은 ecdysone에는 特異한 標的器官(target organ)이 없는 點이다. 昆蟲에 있어서는 대부분의 組織 또는 器官이 ecdysone에 대해서 反應을 보이고 있고, 그 反應의 정도는 각 조직 또는 기관에 따라 다르다(Neufeld Thomason, 1968; Judy·Marks, 1971; Chinzei, 1975). 이러한 사실은 변태기간중 현저한 形態의 變化를 나타내는 中腸도 ecdysone에 의해 中腸特異한 變態 program을 進行시키고 있음을 示唆하고 있다.

本研究는 家蠶의 變態기간中 특히 번데기에서 成蟲에 이르는 동안 中腸에 대한 前胸腺刺激素(PTTH) 및 ecdysone의 影響을 中腸의 外部形態의 變化 및 中

腸組織의 蛋白質變化를 통해 알아보고 그결과를 中腸變態時에 나타나는 物質의 量的變動 및 質的變化의 關係에서 考察하였다(Seong, 1981).

## 材料 및 方法

1. 供試品種 및 飼育: 누에 품종은 錦秋×鍾和을 供試했다. 누에는 25°C에서 甍잎으로 사육하고 上簇 후 羽化까지 25°C에서 保護하였다.

2. 遊離腹部的 作製: 번데기의 遊離腹部는 蛹化直前 혹은 蛹化脫皮中の 누에를 가슴과 배마디사이를 실로 매고(ligaturing) 잡아맨 앞부분은 잘라버린 후 상처부위는 파라핀으로 封하였다. 이렇게 만들어진 유리북부에서는 自然的으로 脫皮가 일어났으며 作製된 번데기의 유리북부는 自然상태에서 약 2週間放置 후 糞실처럼 供試하였다.

3. 除腦蛹의 作製: 吐絲期의 누에를 ether로 마취시킨 후 頭部를 70% ethanol로 消毒하고, 머리 앞부분의 Y봉합을 따라 예리한 면도칼로 切開한 후 핀셋으로 腦를 摘出했다. 摘出수술 후, 25°C에서 2週間보호하고 成蟲分化가 일어나지 않는 것을 확인한 후 實驗에 供試하였다.

4. 糞몬注射: 以上에서 作製한 번데기의 遊離腹部와 除腦蛹에 ecdysone과 PTH를 注射하였다.

Ecdysone은 20-hydroxyecdysone (Rodo製藥製)을 사용하였다. ecdysone은 2%의 ethanol에 용해하여 1個體當 1μl씩 注射하였다. 注射한 ecdysone량은 0.1μg, 1μg 및 10μg의 3區를 設定하였다. 대조구는 2% ethanol 1μl을 注射했다.

PTH 粗抽出物은 東京大學 農學部 農藝化學科 生物有機化學研究室의 厚意에 의해 供與된 것을 使用하였다. 이 PTH粗抽出物은 누에의 成蟲頭部에서 抽出한 것으로 한마리의 頭部에서의 抽出物의 活性은 10~20 Samia units였다. PTH抽出物은 증류수에 용해하고 희석한 후 注射하였다. 注射量은 누에의 頭部 5頭分과 10頭分의 粗抽出液을 각각 1μl씩 주사하였다.

이상의 糞몬注射은 microsyringe를 微量注射裝置에 固定하고 번데기의 腹部第 4·5환절간막을 통해서 注射하였다.

5. 可溶性蛋白質의 抽出 및 polyacrylamide gel 전기영동: 中腸의 可溶性蛋白質은 中腸조직에 濕重量當 10倍의 인산완충생리식염수(PBS; NaCl, 137mM, Na<sub>2</sub>NPO<sub>4</sub>·3.22mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.28mM, pH7.4)를 넣은 후 glass homogenizer로 조직을 磨碎하고, 14,000 r.p.m.에서 20分간 冷遠心하여 그 上清液을 조직抽出液

으로서 分析에 사용하였다.

전기영동은 acrylamide 7.5%, pH9.4用 gel을 사용하여 常法에 따라 slab전기영동을 行하였다. 즉, 分離 gel(acrylamide·7.316%, bisacrylamide·0.814%, Tris·376mM, HCl·60mM, pH8.9, TEMED·0.03%, 過硫酸 ammonium 0.07%)은 13.8cm×15cm의 glass板을 사용하여 만들고 gel의 두께는 2mm로 하였다. 分離 gel위에는 濃縮 gel(acrylamide·2.7%, bisacrylamide·0.625%, HCl·60mM, Tris·61.4mM, pH·6.7, ribofavin·0.5%)을 만들어 40% sucrose-buffer液에 混合한 시료를 濃縮 gel內에 만들어진 폭 0.7cm의 試料溝에 一定量씩 첨가하였다. 泳動은 Tris-glycine 완충액(Tris·0.5mM, glycine·3.8mM, pH8.3) 下에서 1.5mA/gel (cm)의 定電流을 통하여 행하고 bromophenolblue (BPB)을 指示藥으로서 냉장고에서 약 2時間通電, BPB가 약 10cm이동한 時點에서 泳動을 終了하였다. 泳動 終了後의 gel은 7% 酢酸에 溶解한 0.05% coomassie brilliant blue로 1日간 染色하고 7% 酢酸에서 수일 間 脫色한 후 건조 및 사진촬영을 하였다.

## 實驗 結果

蛹化直前 혹은 蛹化脫皮中の 누에로부터 作製한 遊離腹部에 ecdysone을 注射하면 體內에서는 成蟲分化가 進行되었다. 즉, 脂肪體의 形態的 變化, 卵巢의 發育, 直장낭의 形成 등 成蟲化의 특징이 나타나고 동시에 中腸도 정상적인 變態의 특징을 보였다. 그림 1은 호르몬注射 후 日數의 經過에 따른 腸管組織의 濕重量의 變動이다. 암수 모두 ecdysone 注射區에서는 中腸

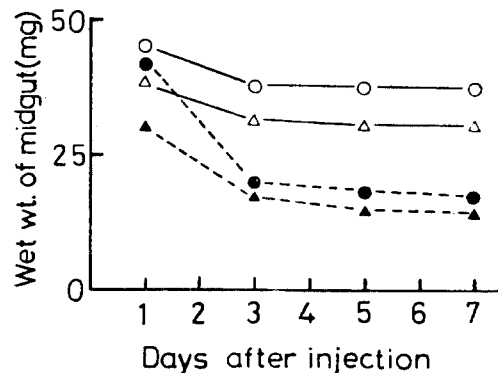
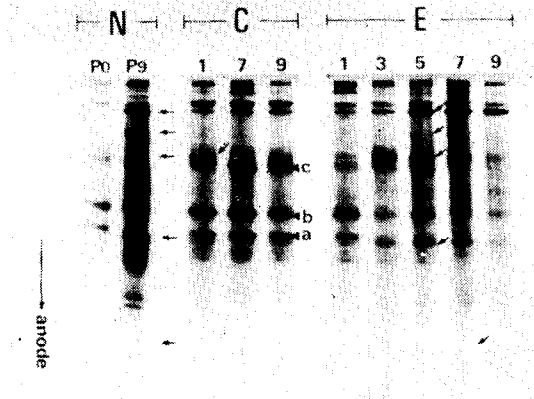


Fig. 1. Changes of wet weights of midguts when 20-hydroxyecdysone was assayed on the pupal isolated abdomens.

○—○ control (female), △—△ control (male)  
●—● ecdysone treated (female), ▲—▲ ecdysone treated (male)

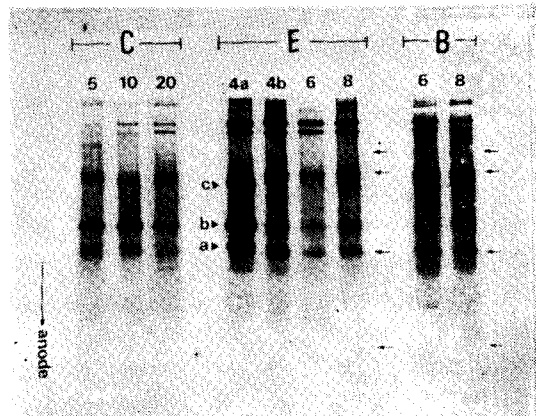


**Fig. 2.** Changes of proteins of epithelial midguts when 20-hydroxyecdysone was assayed on the pupal isolated abdomen. N, normal pupae; C, control (2% ethanol was injected into isolated abdomen); E, ecdysterone was injected into isolated abdomen. Number above each electropherogram represents the day of the developmental stage after hormone treatment. a, b, c: PSP-a, -b and -c. Arrows show the newly synthesized adult proteins.

량의 減少를 보였지만, 對照區에서는 蛹化當時의 中腸量을 그대로 유지하였다. 그밖에 中腸內容物の 形態變化도 호르몬注射區는 正常的인 變態期の 과정을 밟고 있었다.

호르몬注射에 의한 腸管組織단백질의 變化는 이時期와 同組織단백질變化의 특징을 나타내는 蛹特異단백질 (pupal specific proteins, PSP)과 成蟲特異 단백질의 消長을 통해 檢討하였다(Seong 1981). 그림 2에 나타난 바와 같이 ecdysone注射 1日後의 中腸단백질成分은 PSP가 그대로 存在하는 등, 蛹化當時의 中腸단백질과 거의 差異가 없었다. 그러나 注射後 日數의 經過에 따라서 PSP는 消滅하는 反面, 새로이 成蟲型단백질成分이 出現하여, 正常的 成蟲分化를 完了한 中腸단백질 성분과 같은 단백질 變化樣相을 나타냈다. 이에 대해 대조구의 경우는 注射後, 日數의 經過에 關係없이 蛹化當時의 典型的인 蛹단백질의 泳動像을 그대로 유지하고 있었다.

吐絲 2일째 누에를 除腦하면 正常蠶보다 1~2일 늦게 蛹化脫皮가 일어나지만 그후는 體内の 成蟲分化가 進行되지 않는 소위 永續蛹(dauer pupa)이 된다. 이 永續蛹에 PTTH 혹은 ecdysone을 注射하면 곧 活潑한 成蟲分化가 이루어지고 있음이 밝혀졌다. 그림 3은 除腦한 永續蛹에 ecdysone 및 PTTH를 注射한 후 경과



**Fig. 3.** Changes of proteins of epithelial midguts when 20-hydroxyecdysone and brain extract were assayed on the dauer pupae. C, control (dauer pupae); E, ecdysone treated (1 $\mu$ g); B, brain extract (PTTH); 4a: 1 $\mu$ g, 4b: 10 $\mu$ g. All other symbols are the same as in Fig. 2.

일수별 中腸조직 단백질의 電氣泳動像을 나타낸 것이다. ecdysone 注射後 4일째의 中腸은 호르몬의 注射量에 따라 단백질의 變化가 달랐다. 즉 1 $\mu$ g의 注射區에서는 아직 PSP가 檢出되고 있지만 10 $\mu$ g注射區에서는 이들 蛹特異한 단백질은 거의 나타나지 않고 있다. 그러나 注射후 4일째 이후부터는 ecdysone의 注射量에 關係없이 PSP는 消失되고 成蟲型단백질이 出現하는 등 中腸은 正常的인 成蟲分化時의 蛋白質 變化를 보였다(그림 3-E).

이와 같은 蛋白質의 變化는 PTTH의 注射에 의해서도 同一한 結果가 얻어졌다. 그리고 이번에 注射한 PTTH의 量에 있어서 5頭分과 10頭分과의 사이에 호르몬의 影響에는 差異가 認定되지 않았다(그림 3-B).

이상의 兩 호르몬注射區에 대하여 對照區(永續蛹)의 경우에는 蛹化脫皮後 日數의 經過에 關係없이 PSP는 여전히 存在하고, 中腸의 形態도 蛹化初期의 狀態에서 거의 變化가 없었다. 단 일부의 成蟲型단백질이 흔적으로 橫出되고 있는데 이것은 永續蛹의 내부에서 극히 미미하나마 약간의 成蟲化發育이 이루어지기 때문일 것으로 생각된다.

## 考 察

Ecdysone은 幼蟲의 成長에 직접 關與하는 脫皮와 變態를 조절하는 호르몬이다. 즉, ecdysone은 脫皮時에는 큐티클의 分泌를 促進시키고, 變態時에는 번데기 및 成蟲의 큐티클形成과 그의 着色, 그밖에 各種 成蟲

原基의 形態形成등 번데기 혹은 成蟲에로의 分化를 誘導한다. 同時에 ecdysone은 脫皮 및 變態時의 形態變化의 物質의 基盤이 되고 있는 細胞以下의 分子수준의 變化, 즉 단백질, 核酸, 酵素등의 合成도 誘導하고 있음이 밝혀지고 있다(大瀧·櫻井 1975)

Keely(1978)는 脂肪體, 眞皮細胞, 成蟲原基가 ecdysone의 主要標의 器官임을 報告하고 있지만 일반적으로 ecdysone은 特異한 標의器官은 없고 反應程度의 差異는 있으나 대부분의 組織 혹은 器官이 ecdysone에 대해서 고루 反應을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다(Neufeld·Thomason, 1968; Chinzei, 1975). 이러한 사실은 變態期間中 현저한 形態的 및 物質的 變化를 수반하는 中腸器官도 ecdysone에 의해 中腸 特異한 變態 program이 이루어지고 있음을 추측할 수 있다.

누에의 中腸은 幼蟲期에 攝取한 食物의 消化와 吸收를 담당하는 消化器官의 主體가 되고 있으나 變態와 함께 中腸의 外形은 현저하게 작아지고 組織의 更新과 함께 榮養物의 消化·吸收라는 本來의 機能은 體內的 金屬이온의 排出 및 羽化時의 cocoonase의 生成등 中腸은 形態的·機能의 一대 變革을 초래한다(辻日, 1943; Judy & Gilbert, 1970; Waku and Sumimoto, 1971, 1974; 赤井, 1978; 小林 1978). 특히 成等(1983)은 이러한 變態期의 中腸의 內部的 形態變化를 lysosome 由來의 酸性 phosphatase와 酸性핵산分解酵素 등 加水分解에 의한 細胞의 autolysis라는 관점에서 考察하였다.

이러한 中腸의 形態的變化는 變態期間中の 各種 物質的 變動이 이를 뒷받침하고 있으며, 특히 polyacrylamide gel 전기영동과 免疫學의 方法에 의한 中腸조직의 蛋白質變化는 變態期間中 各 발육단계를 蛋白質群에 의해 나눌 수 있는 근거가 되었다(Seong, 1981). 즉 中腸組織 단백질은 共通의 단백질 분포에 따라 幼蟲型·蛹型·成蟲型的 3종류로 나눌 수 있으며, 이와 같은 발육시기별 단백질의 質的變化는 그 자체가 일정한 變態program(遺傳子의 조절)에 의해 진행되는 中腸變態의 특징이라고도 하겠다.

前報(Seong, 1981)에 의하면, 成蟲分化時의 中腸조직 단백질의 變化의 특징은 (1) 蛹特異한 단백질(PSP)의 消失, (2) 새로운 成蟲型 단백질의 生成이었다. 따라서 本研究에서는 腦-前胸腺의 內分泌系에 의한 ฮอร์โมน의 活性가 存在하지 않도록 미리 作製된 번데기의 遊離腹部나 永續蛹을 利用하여, 變態時 中腸組織에서 보이는 蛋白質의 時期別 變化가 실제 ฮอร์โมน의 投與에 의해 誘導되는가의 與否를 檢討하였다. 實驗結果에서 보인 바와 같이 번데기의 遊離腹部에 ecdysone을 注射

한 경우 中腸의 濕重量의 變動이 認定되는 注射後 3日 經부터 단백질의 變化가 일어나 PSP의 消失 및 成蟲型단백질이 出現하였다. 이와 同一한 結果는 永續蛹에 대한 ecdysone 및 PTTH의 注射에 의해서도 얻어졌다. 따라서 번데기의 中腸은 腦-前胸腺(PTTH)의 分泌에 의해 活性化된 前胸腺으로부터의 ecdysone 분비에 의해 그의 成蟲分化가 이루어지고 있음이 確認되었다. 또한 이때 使用한 ecdysone은 1 $\mu$ g의 量을 1회의 投與로 成蟲分化에 充分하였으며, 이러한 사실은 同齡蛹의 蛹中腸에 대한 作用기구로서 Trigger說(Ashburner, 1972)을 支持하게 해 주는 하나의 자료가 된다 하겠다.

이상의 中腸에 대한 ฮอร์โมน의 作用은 中腸을 體外培養하여 他기관 및 體內殘留 ฮอร์โมน의 影響을 完全히 排除한 in vitro 實驗系을 利用하여 더욱 明確한 事實을 얻을 수 있을 것으로 期待된다.

## 摘 要

家蠶中腸의 成蟲分化에 미치는 ฮอร์โมน의 作用을 알기 위하여 번데기의 遊離腹部 및 除腦시킨 永續蛹에 20-Hydroxyecdysone과 前胸腺자극ฮอร์โมน(PTTH)를 投與하고, 이에 따른 中腸의 形態的變化와 中腸組織단백질의 變化를 polyacrylamide gel 전기영동으로 조사하였다. 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 번데기의 遊離腹部에 ecdysone을 注射하면 體內的 各 組織 및 器官에서는 成蟲分化가 일어났다. 中腸의 濕重量의 變動을 조사한 結果, ฮอร์โมน注射후 3日 經부터 重量이 減少하는 등 마치 正常蟲에서와 같은 中腸의 變態樣相을 나타냈다. 한편 中腸組織에서는 蛹特異한 단백질(PSP)이 消失되고 새로운 成蟲型단백질이 生成되었다. 이와같은 中腸조직에서의 단백질變化樣相은 永續蛹에 ecdysone과 PTTH를 投與한 경우에도 同一한 結果를 나타냈다.

2. 以上の 結果, 蛹-成蟲에의 中腸變態는 PTTH의 자극에 의해 活性化된 前胸腺에서 分泌되는 ecdysone에 의해 誘導되고 있음이 確認되었다.

## 引 用 文 獻

- 赤井弘(1970), 細胞 10, 730-742.  
 Ashburner, N. (1973) *Develop. Biol.* 35, 47-61.  
 Chinzei, Y. (1975) *Appl. Ent. Zool.* 10, 136-138.  
 Fukuda, S. (1944) *J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ. Sec. IV.* 477-532.  
 Judy, K.J. and Gilbert, L.I. (1970) *J. Morph.* 131,

- 277-300.
- Judy, K.J. and Marks, E.P. (1971) *General and Comp. Endocrinol.* 17, 351-359.
- Keeley, L.L. (1978) *Ann. Rev. Entomol.* 23, 329-352.
- 小林正彦(1978) *細胞* 10, 743-750.
- Kuniyuki, A.H. and Fristrom, J.W. (1977) *Insect Biochem.* 7, 169-173.
- Neufeld, G.J. and Thomason, J.A. (1968) *J. Insect Physiol.* 14, 789-804.
- Oberlander, H. (1976) *In Vitro* 12, 225-235.
- Oberlander, H. and Leach, C.E. (1978) *In Vitro* 14, 723-727.
- 大瀧哲也・櫻井勝 (1975) *蛋核酵* 20, 561-573.
- Seong, S.I.(1981) *Appl. Ent. Zool.* 16, 138-148.
- 成洙一・吉武成美・小林正彦 (1983) *日蠶雜* 52, 191-197.
- Siegel, J.G. and Fristrom, J.W. (1974) *Develop. Biolog.* 41, 314-330.
- 藤條純夫・鎮西康雄(1977) *植物防疫* 31, 303-310.
- 辻田光雄(1943) *蠶試報* 11, 211-293.
- Waku, Y. and Sumimoto, K. (1974) *Tissue and Cell* 6, 127-136.
- Williams, C.M. (1946) *Biol. Bull. Woods Hole* 90, 234-243.