

누에 體液主蛋白質에 관한 生化學的 研究

成 洙 一

水原大學 生物學科

Biochemical Studies on the Major Hemolymph Proteins (MHPs) of the Silkworm, *Bombyx mori*

Su Il Seong

Department of Biology, Suwon College

Summary

Polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography were applied to investigate the developmental profiles of the major hemolymph proteins (MHPs) and their biosynthesis. In addition, some biochemical methods were also used to isolate and purify the MHPs. The obtained results are summarized as follows.

1. MHP-a began to appear from the 2nd day of the fourth-instar larva while MHP-b and -c were detected first on the 1st day of the fifth-instar larva. All these proteins, however, showed a drastic increase in concentration at the 2nd day of the fifth-instar larva.
2. MHP-b and -c were synthesized in fat body on early day of the fifth-instar larva, but the possibility of MHP-a synthesis in fat body was excluded.
3. MHP-b was isolated and purified by heat-treatment (60°C), gel filtration on Sephadex G-100 and column chromatography on DEAE-cellulose and CM-cellulose. Purified MHP-b showed a single band on polyacrylamide gel- and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

I. 緒 論

昆蟲의 체액단백질에 관해서는 Telfer & Williams (1953) 및 Telfer (1954)가 *cecropia* 나방(*Hyalophora cecropia*)으로부터 female specific protein을 발견한 이래 數種의 단백질이 分離精製되었고, 이들의 分子의 特性 및 生理的 기능이 속속 밝혀졌다. 이러한 체액단백질의 분자적 특성 및 생리적 기능에 따라 누에의 체액단백질은 貯藏단백질(SP1, SP2: Tojo *et al.*, 1980), 小分子단백질(30K proteins: Gamo 1978; Izumi *et al.*, 1981) 및 vitellogenin(Doira & Kawaguchi, 1972; Ono *et al.*, 1975; 井口·中井, 1978) 등 크게 3개의 단백질群으로 나눌 수 있다. 이들 단백질은 대개 脂肪體에서 合成된 후(Shigematsu, 1958; Price & Bosman,

1966; Chippendale & Kilby, 1969), 체액을 매개로 피부, 지방체, 소화관, 생식소 등 체내의 여러 조직·기관에 이동되어 비교적 짧은 기간내에 이루어지는 成蟲化 과정에 利用되고 있다(Laufer, 1960; Loughton & West, 1965; Hudson, 1966; Patel, 1971).

Seong *et al.* (1985)은 전기영동 및 면역침청학적 실험에 의하여 누에의 유충 5령 3일 이후 체액내에 多量으로 出現하는 3개의 단백질성분을 檢出하여 체액主蛋白質(Major Hemolymph Protein, MHP)이라 命名하였고 이들의 成蟲化 과정 및 胚子發育에 따른 조직간의 移動, 分布 및 利用 등을 종합하여 MHP는 一種의 저장성단백질일 가능성을 提唱하였다.

本研究는 우선 MHP의 合成 과정에 주목하여 그의 精確한 出現 시기 및 合成場所를 추적하고, 이어서 MHP의 순수분리 精製법을 確立함으로서 이들 단백질

이 논문은 1985년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

의 물리·화학적 性狀 및 생리적기능을 설명하는 기초 자료를 얻고자함을 목적으로 한다.

본연구는 1985년도 문교부 학술연구조성비에 의해 수행되었음을 밝혀둔다.

II. 材料 및 方法

1. 실험곤충

누에잠충은 錦秋×鍾和를 使用하였고 25°C에서 甬 앞사육후 나방이가 될때까지 25°C에서 보호하였다.

2. 시료의 조제 및 전기영동

체액은 유충, 번데기 및 나방이로부터 分析에 필요한 시기에 적당량 채취하였고, 採血時는 시험관내에 미리 少量의 phenylthiourea를 넣어 체액의 melanosis를 防止하였다. 채혈후 5°C에서 원심(5,000g, 10min)하고 그의 상청액을 전기영동의 시료로 사용하였다.

脂肪體의 可溶性단백질의 분석에는 지방체 新鮮重에 대해 5배량의 인산완충생리식염수(PBS, pH 7.4)를 넣어 조직을 마쇄하고 20,000에서 20분간 저온원심한후 그 상청액을 시료로 사용하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동은 前報(成, 1984)에 의해 행하였으며 분석에 사용된 시료량은 체액 1 μ 였다.

SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동의 분리 gel은 10% acrylamide, 0.375M Tris-HCl buffer (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.1% 過硫酸암모늄 및 0.01% TEMED이며 농축 gel의 조성은 5% acrylamide, 0.125M Tris-HCl buffer (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% TEMED였다. 시료단백질의 SDS처리는 최종농도 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) 및 20% glycerol의 混合液에서 100°C, 5분간 행하였다. 泳動은 Tris-glycine buffer (5mM Tris, 38mM glycine, pH 8.3) 下에서 2.5mA/gel(cm)의 定電流에 의해 실온에서 5시간 通電하였다. 영동후 gel은 염색액(0.025% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid)에서 1日間염색하고 25% methanol-7% acetic acid의 混合液에서 脫色하였다.

3. Autoradiography

단백질합성은 slab 전기영동 gel의 autoradiography에 의해서 조사하였으며 단백질 合成의 前驅體로서는 방사성아미노산 14 C-leucine(比放射能 339mCi/mmol, 2% alcohol, 放射能농도 50 μ Ci/ml)을 사용하였다.

Isotope의 처리는 체액내에 MHP가 출현하는 시기를 기준하여 유충 5령 3일에 누에 個體當 2.5 μ Ci/50 μ l을 주사하고, 그 밖에 蛹化當日의 번데기 및 羽化當日의 나방이에도 같은양의 방사성물질들을 처리하여 발육시키

별 단백질合成을 조사하였다.

Isotope처리후 3시간째 체액 및 지방체를 채취하고, 시료채취후는 앞에서와 같이 전기영동을 하여 염색과 탈색 및 건조를 한후 gel 위에 X선 필름(Sakura X-ray film)을 밀착시켜 약 4주간의 노출을 시킨 후 소정의 현상을 행하였다.

4. MHP-b의 정제

(1) 열처리

MHP가 고농도로 함유되어 있는 토사기의 체액단백질을 2배량의 PBS로 희석하여 열처리(65°C, 10분간)한 후 저온원심(10,000g, 10分)하여 그의 상청액을 취하였다.

(2) Gel filtration

Gel여과는 Sephadex G-100(Pharmacia Fine Chemical 社製)을 사용하였다. Sephadex G-100을 2.7 \times 44 cm의 column內에 0.01M의 acetate buffer (pH 6.0)을 사용하여 33cm 높이로 充積시키고 bed 상단에 40% sucrose에 混入한 시료를 첨가한후 2ml/cm²/h⁻¹의 流速으로 gel여과 시켰다.

(3) Ion Exchange Chromatography

Ion exchange chromatography는 음이온 및 양이온교환체로서 DEAE-cellulose와 CM-cellulose (Whatman 社製)를 사용하였다. 兩이온교환체中 DEAE-cellulose는 0.01 M phosphate buffer(pH 8.0)를, 그리고 CM-cellulose는 acetate buffer(pH 6.0)를 각각 사용하여 1.2 \times 10cm의 column內에 各各 充積시키고, 60ml/hr/sq.의 流速으로 chromatography를 행하였다.

5. 단백질정량

단백질정량은 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBB) 시약을 이용한 Bradford (1976)의 색소결합법에 의하였다. 즉 Coomassie Brilliant Blue G-250을 85%(w/v) 인산에 0.1% 농도로 용해시킨후 증류수로 5배 희석하여 여과한다음, 실온에서 약 2주일간 안정시켜 만들어진 CBB 시약을 단백질정량에 사용하였다.

反應은 단백질(50 μ g 이내)을 증류수에 용해하여 1.5 ml로 하고 여기에 CBB시약 1.5ml를 混合하여 1~2분 방치후 흡광도 595nm에서 비색정량 하였다.

III. 實驗結果

1. MHP의 出現

유충 4령初日부대 5령 6일까지의 체액단백질의 변화를 보면 4령누에에 비하여 5령누에의 체액에 단백질의 종류나 농도에 있어서 현저한 증가를 나타내고 있다(그림 1).

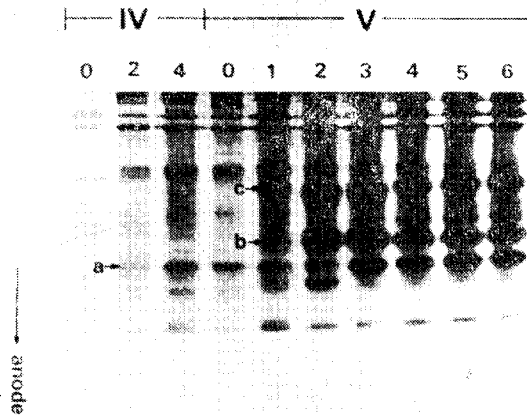


Fig. 1. Profiles of hemolymph proteins of female silkworm. IV, fourth-instar larva; V, fifth-instar larva. Number above each electrophogram represents the day of developmental stage. a, b, c: MHP-a, -b, -c.

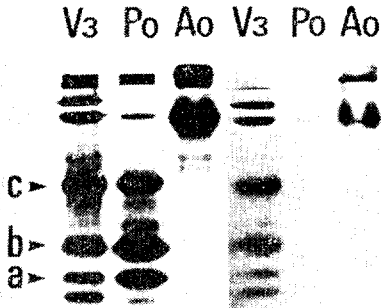


Fig. 2. Autoradiograph (right) showing the incorporation of ^{14}C -leucine into larval (V3), pupal (P0) and adult (A0) hemolymph proteins of female silkworm at 3hr. after isotope treatment. a, b, c: MHP-a, b, c. Left: electrophoretogram of hemolymph proteins.

MHP에 대하여 보면, b와 c성분은 5령 1일부터 출현한 것에 비하여 a성분은 이미 4령 2일부터 검출이 가능하였고, b와 c성분이 출현후 곧 체액에서 급격한 농도의 증가를 보인 것에 반하여 a성분은 출현후 4~

5일간 완만한 농도의 증가를 보이는 등 a와 b, c성분간에는 단백질변화상에 현저한 차이점이 발견되었다. 그러나 a, b, c 3성분은 모두 5령 2-3일부터 급격한 농도의 증가를 보여 최대의 농도를 나타내는 吐絲期에는 전체 단백질량의 약 42%의 점유율을 보이고 있다(Seong *et al.*, 1985).

2. MHP의 合成

유충 5령 3일, 蛹化當日 및 羽化當日の 체액단백질에 대한 ^{14}C -leucine의 incorporation을 조사한 결과, 유충기의 체액에서는 대부분의 단백질 band가 강한 방사활성을 나타냈고, 나방어의 체액에서도 비교적 강한 방사활성이 인정되었으나, 번데기의 경우는 극히 미미하였다(그림 2).

MHP에 대한 방사성아미노산의 incorporation을 보면 a, b, c 共히 유충의 체액에서 강한 방사활성을 보인 반면 蛹化當日에는 이들 단백질이 체액내에 高濃度로 존재하고 있음에도 불구하고 incorporation은 거의 발견할 수 없었다.

한편 같은 時期의 지방체단백질에 대한 방사활성을 조사하여 보면, 유충 5령 3일의 지방체의 경우 數種의 단백질에서 방사활성이 검출되었고 특히 b, c성분에서 강한 활성을 발견할 수 있었다. 이것에 비하여 MHP가 비교적 풍부하게 함유되어 있는 化蛹當日の 지방체



Fig. 3. Autoradiograph (right) showing the incorporation of ^{14}C -leucine into larval (V3) and pupal (P0) fat body proteins of female silkworm at 3hr after isotope treatment. a, b, c: MHP-a, -b, -c. Left: electrophoretogram of fat body proteins.

에서는 거의 방사활성이 인정되지 않아 앞에서 유충기의 지방체와 좋은 대조를 보이고 있다(그림 3).

5령기의 지방체에서 방사활성이 인정안된 MHP의 a 성분은 본실험만으로 그의 정확한 합성장소를 밝힐 수는 없으나 그림 2에서와 같이 유충 5령 3일의 체액에서 a 성분 역시 뚜렷한 방사활성을 나타내는 점으로 보아 이 단백질은 지방체 이외의 他조직세포에서 합성될 가능성이 높아졌다. 그러나 앞에서 언급한 바와 같이 a 성분은 이미 4령 2일 이후의 체액에서도 검출이 가능하다는 사실을 고려하면 同단백질의 정확한 합성시기 및 합성장소에 대해서는 좀더 검토할 문제로 남는다.

이상의 결과로부터 MHP는 5령初 지방체에서 生成되는 b와 c 성분이 거의 같은 시기이거나 혹은 그 이전부터 지방체이외의 他장소에서 生成되어지는 것으로 보이는 a 성분과 함께 체액에 방출, 5령유충의 성장 발육에 따라 체액내에 多量으로 축적되어지고 있음을 알 수 있다.

3. MHP-b의 精製

MHP의 a, b, c 성분을 각각 순수분리 정제할 목적으로, 우선 이들 단백질군에 대한 열저항성, 포화유안분획 등의 예비실험을 행하였다. 그 결과 b 성분이 65°C의 열처리에도 안정되므로서 우선 b 성분의 정제에 着手하였다(그림 4).

MHP가 가장 고농도로 함유되어 있는 토사기의 체액을 2배량의 PBS로 희석하여 65°C에서 5분간 열처리

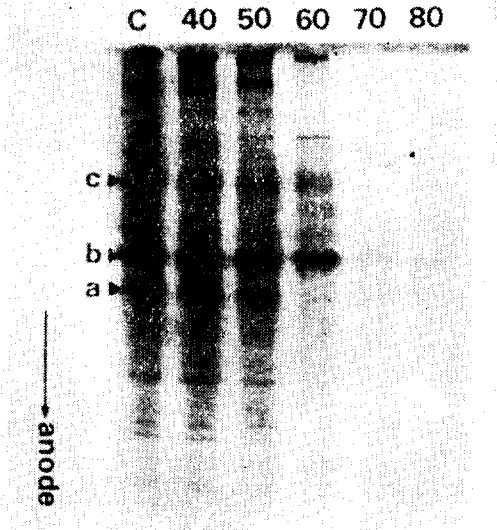


Fig. 4. Electrophorogram showing the stability of hemolymph proteins over the heat-treatment. Number above each electrophorogram represents the degree (°C) of heat-treatment. C: non-treated hemolymph. a, b, c: MHP-a, -b, -c.

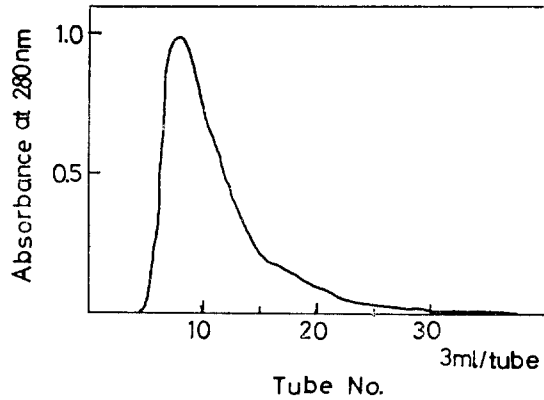


Fig. 5. Chromatography of heat-treated hemolymph on DEAE-cellulose. A column of DEAE-cellulose (1.2×10cm) was equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 8.0). The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 60ml per hour.

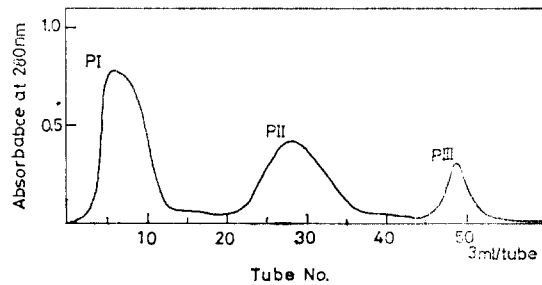


Fig. 6. Gel filtration on Sephadex G-100 of DEAE-cellulose fraction. A column of Sephadex G-100 (2.7×44cm) was equilibrated with 0.01M acetate buffer (pH 6.0). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 12ml per hour.

한 후 원심하고 그 상청액을 0.01M phosphate buffer (pH 8)에 24시간 투석하였다.

투석후 上清液에 대하여 DEAE-cellulose chromatography를 행하고(그림 5), 얻어진 分割을 Sephadex G-100 column에 의해 gel 여과시켜, b 성분이 함유된 P II 分割을 얻었다(그림 6). P II 分割은 이어서 0.01M acetate buffer (pH 6)에 24시간 투석시킨 후 그 상청액에 대하여 CM-cellulose chromatography를 행하였다. CM-cellulose內에 吸着된 목적단백질(MHP-b)의 溶出은 0.01M acetate buffer 100ml와 0.5M NaCl을 함유한 同완충액 100ml와의 linear gradient용출에 의하였다(그림 7).

이상의 각 정제단계별 b단백질의 확인은 polyacry-

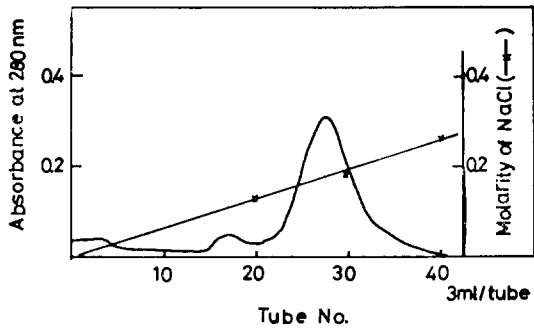


Fig. 7. Chromatography of Sephadex G-100 fraction (PII) on CM-cellulose. A column of CM-cellulose (1.2×10 cm) was equilibrated with 0.01M acetate buffer (pH 6.0). The column was eluted with a linear gradient of 0~0.5 M NaCl containing 0.01M acetate buffer (pH^{*}6.0) at a flow rate of 60ml per hour.

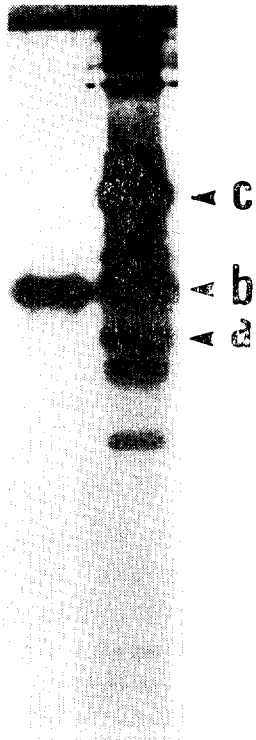


Fig. 8. Polyacrylamide gel electrophoresis showing the purification of MHP-b. a, b, c: MHP-a, b, c.

lamide gel 전기영동에 의하였으며 또한 정제단계별 b 단백질의 회수율은 表 1과 같다. 이렇게하여 최종 분리·정제된 단백질의 순도를 polyacrylamide gel 전기

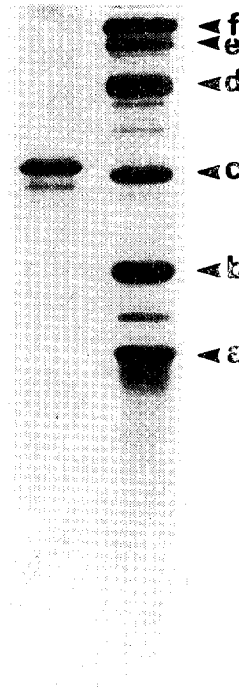


Fig. 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified MHP-b (left) and standard proteins (right). a, lysozyme (molecular weight: 14,400); b, soybean trypsin inhibitor (21,500); c, carbonic anhydrase (31,000); d, ovalbumin (45,000); e, bovine serum albumin (66,200); f, phosphorylase B (92,500).

Table 1. Purification and protein recovery of MHP-b

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Recovery (%)
Hemolymph	2.5	220	100
Heat-treatment	4.8*	155	70
DEAE-cellulose fraction	45	110	50
Sephadex G-100 fraction	36	27.7	12
CM-cellulose fraction	30	17.5	8

* Hemolymph (2.5ml) of late fifth-instar larva was diluted twice with PBS before heat-treatment.

영동(그림 8) 및 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(그림 9)으로 확인한 결과 거의 100%의 정제도를 나타내는 단일 band를 얻는데 성공하였다.

IV. 考 察

MHP는 분자량 17,000~29,000의 저분자단백질로서 (Seong *et al.*, 1985), Izumi *et al.* (1981)의 30K 단백질이나 Gamo (1978)의 小分子 lipoprotein과 같은 부류에 속하며, 이 단백질群에는 약 15개의 성분이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Izumi, *et al.*, 1981).

그러나 인시목곤충의 체액단백질중 storage protein이 成蟲化과정의 성충조직형성에 利用되며 (Price, 1973; Thomson, 1975; Robert *et al.*, 1977; Tojo *et al.*, 1978, 1980), vitellogenin이 난황단백질의 전구체로서의 역할을 하는 등 (Telfer & Williams, 1953; Telfer, 1954; Hill, 1962; Orr, 1964a, b), 단백질에 따라서는 그의 기능적 특성이 밝혀진 것도 있으나, MHP를 비롯한 이들 저분자단백질군의 기능에 대해서는 아직 알려져 있지 않다.

Seong *et al.* (1985)은 MHP가 유충 5령 중기 이후 번데기의 중기에 걸쳐 체액을 비롯한 중장, 지방체, 난소, 경소등 작조직에 골고루 분포되고 있으며, 成蟲化발육에 따라 이들 조직으로부터 소멸되어 없어지는 점, 또한 난소에 移行된 多量の 이들 단백질성분이 산란후 배자의 발육과 함께 소비되어 난내 vitellin과 유사한 운명을 나타내는 점등을 종합하여 MHP는 一種의 저장성단백질 일 것이라고 推定하였다. 그러나 이 단백질이 성충화발육과정에서 조직 특이성을 보이지 않고 또한 性的 差異性도 나타내지 않음으로 卵巢 혹은 알을 제외한 他조직에서의 생리적 기능을 여전히 不明한 상태에 있다.

보통 단백질정제의 의의는 어느 特定 효소와 같이 그의 기능이 알려진 단백질을 순수한 상태로 얻음으로서 그 분자의 물리·화학적 성질을 밝히고 나아가서 유용상품으로서의 가치를 높이는 데 있다. 그러나 기능이 不明한 단백질의 경우에는 우선 단백질을 정제하고 그의 抗血清을 만들어 螢光抗體法을 利用한 세포내의 존재 부위를 알아내므로써 목적단백질의 生理的 기능을 추정할 수도 있다.

본연구에 의해 MHP의 b단백질 성분은 그의 정제가 完了되어 현재 抗血清作成 중이며, 나머지 a와 c 성분도 곧 정제법이 確立될 단계에 있다. 앞으로 이들 정제된 단백질에 대한 아미노산조성 각종 물리·화학적 성질 및 세포내 分布 등이 밝혀지리라 보며 궁극적으로 成蟲化發育에 따른 체내 조직에서의 기능적 특성도 규명될 것으로 전망된다. 나아가서 최근 곤충번데기의 分子機構를 해명할 목적으로 시도되는 인시목곤충의

체액단백질 유전자의 구조해명, 유전자발현제어기구의 해석 등 昆蟲을 이용한 分子生物學의 연구의 기초자료로서 MHP의 역할이 기대되며 보다 효율성높은 MHP의 정제법의 확립 또한 강구되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

누에의 유충 체액내에 多量으로 존재하는 低分子 체액단백질(MHP)의 체액內의 出現時期, 체내 生合成에 관하여 polyacrylamide gel 전기영동 및 autoradiography로 조사하고, 동시에 MHP의 b성분에 대한 분리·정제를 시도하였다.

얻어진 연구결과는 다음과 같다.

1. MHP의 a성분은 유충 4령 2일의, 그리고 b와 c 성분은 5령 1일의 체액에 각각 출현하기 시작하여 5령 2일 이후 급격한 농도의 증가를 보였다.

2. MHP의 b와 c성분은 유충 5령초기의 지방체에서 生合成된 후 곧 체액에 방출되나 a성분의 정확한 합성 장소와 시기는 不明하다.

3. 토사기의 유충 체액을 열처리(60°C, 5분), gel여과 및 DEAE-cellulose와 CM-cellulose chromatography法에 의해 분리·정제한 결과 순도가 거의 100%에 가까운 MHP-b를 얻었다.

引 用 文 獻

- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Chem.*, 29, 944.
- Chippendale, G.M. and Kilby, B.A. (1969) Relationship between the proteins of the hemolymph and fat body during development of *Pieris brassicae*. *J. Insect Physiol.* 15, 905-926.
- Doira, H. and Kawaguchi, Y. (1972) Changes in hemolymph and egg protein by the castration and implantation of the ovary in *Bombyx mori*. *J. Fac. Agri. Kyushu Univ.* 17, 117-125.
- Gamo, Y. (1978) Low molecular weight lipoproteins in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*: Inheritance, isolation and some properties. *Insect Biochem.* 8, 457-470.
- Hill, L. (1962) Neurosecretory control of hemolymph protein concentration during ovarium development in the desert locust. *J. Insect Physiol.* 8, 609-619.
- Hudson, A. (1966) Protein in the hemolymph and other tissues of the developing tomato hornworm,

- Protoparce quinquemaculata*. Canad. J. Zool. 44, 541-555.
- 井口民夫・中井正憲 (1978) 家蠶の ビテロジェニンに關する研究, I. 同定とうミノ酸組成. 蠶試報 27, 579-593.
- Izumi, S., Fujie, J., Yamada, S. and Tomino, S. (1981) Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. Biochimica et Biophysica. 670, 222-229.
- Laufer, H. (1960) Blood proteins in insect development. Ann. N.Y. Acad. Sci. 89, 490-515.
- Loughton, B.G. and West, A.S. (1965) The development and distribution of hemolymph protein in Lepidoptera. J. Insect Physiol. 11, 919-932.
- Ono, S., Nagayama, H. and Shimura, K. (1975) The occurrence and synthesis of female- and egg-specific proteins in the silkworm. Insect Biochem. 5, 313-329.
- Orr, C.W.A. (1964a) The influence of nutritional and hormonal factors on egg development in the blowfly *Phormia regina*. J. Insect Physiol. 10, 53-64.
- Orr, C.W.A. (1964b) The influence of nutritional and hormonal factors on the chemistry of the fat body, blood and ovaries of the blowfly, *Phormia regina*. J. Insect Physiol. 10, 103-119.
- Patel, N.G. (1971) Protein synthesis during insect development. Insect Biochem. 1, 391-200.
- Price, G.M. (1973) Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. Biol. Rev. 48, 333-375.
- Price, G.M. and Bosman, T. (1966) The electrophoretic separation of proteins isolated from the larva of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. J. Insect Physiol. 12, 741-745.
- Robert, D.E., Wolfe, J. and Akam, M.E. (1977) The developmental profiles of two major hemolymph proteins from *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 23, 871-878.
- 成洙一 (1984) 家蠶の中腸變態에 관한 内分泌學的 研究. 韓蠶誌 21(1), 30-34.
- Seong, S.I., Park, K.E., Nagata, M. and Yoshitake, N. (1985) Effect of metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2, 91-104.
- Shigematsu, H. (1958) Synthesis of blood proteins by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori* L. Nature, Lond. 182, 880-882.
- Telfer, W.H. (1954) Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited protein in egg formation by the cecropia silkworm. J. Gen. Physiol. 37, 539-558.
- Telfer, W.H. and Williams, C.M. (1953) Immunological studies of insect metamorphosis. I. Qualitative and quantitative description of the blood antigens of the cecropia silkworm. J. Gen. Physiol. 36, 389-413.
- Thomson, J.A. (1975) Major patterns of gene activity during development in holometabolous insects. Adv. Insect Physiol. 11, 321-398.
- Tojo, S., Betchaku, T., Ziccardi, V.J. and Wyatt, G.R. (1978) Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. J. Cell Biol. 78, 823-838.
- Tojo, S., Nagata, M. and Kobayashi, M. (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 10, 289-303.