

幼若홀몬이 家蠶의 體液蛋白質 및 아미노酸의 變動에 미치는 影響

孫 興 大

東亞大學校 農科大學

Effects of Juvenile Hormone Analogue on Changes of Protein and Amino acids
in Haemolymph of the Silkworm, *Bombyx mori*.

Hung Dae Sohn

College of Agriculture, Dong-A University

Summary

The experiment was carried out to investigate the effects of juvenile hormone analogue on changes of protein and amino acids in haemolymph of silkworm larva.

Juvenile hormone analogue was topically administered to larvae at dose of 1 μ g and 10 μ g per gm of body weight at 60hr. of the 5th instar.

The results obtained were as follows;

1. Larval duration of the fifth instar was extended about 1 day by JHA-1 and 4 days by JHA-10 as compared with the control.
2. Cocoon weight and cocoon layer weight by topical application of JHA were heavier than those of the control, but cocoon layer ratio was decreased in JHA-10 to the exclusion of JHA-1.
3. The concentration of haemolymph protein during the fifth instar was increased remarkably by the JHA application.
4. The total content of amino acids in haemolymph proteins of JHA-10 approximately doubled that of the control, with the conspicuous increase of glycine and arginine level.

緒 論

幼若홀몬은 昆蟲의 成長, 變態, 卵成熟, 體色 등을 調節하는 物質로서 *Cecropia*蠶에서 單離되어 그 化學的 構造가 決定(Röller et al; 1967)된 이래 오늘날에는 약 2,500여종 이상의 幼若홀몬 活性物質이 알려져 있다(Gilbert & King; 1973).

幼若홀몬을 누에의 5齡初期에 투여하면 幼蟲期間이 연장되고 蠶體重, 繭重 및 繭層重 등이 증가되므로 養蠶의 生産性 向上을 목표로 하여 幼若홀몬의 실용적 이용에 대한 많은 연구가 진행되어왔다(Akai & Kobayashi; 1971, Akai & Kiguchi; 1971, Chang et al; 1972, 室賀等; 1975, 小針・赤井; 1978, 馬等; 1978,

馬等; 1984).

한편 幼若홀몬치리에 의하여 脂肪體의 DNA 및 蛋白質合成은 지속되나 (重松; 1978) 絹絲腺의 DNA, RNA 및 蛋白質合成은 일단 억제된 후 다시 증가되므로 (赤井等; 1973, 倉田・Dailie; 1978, 倉田; 1978, Shigematsu; 1982) 組織에 따라 幼若홀몬의 作用은 서로 相異한 反應을 나타낸다.

또 幼若홀몬을 經皮投與하면 먼저 體液으로 移行한 뒤 각 조직으로 移行되고, 蠶體內的 分포양상은 血液, 中腸, 絹絲腺, 脂肪體等 각 기관마다 다르며, 經時的 變化를 나타낸다고 한다(島田等; 1981, 赤井・田村; 1985).

이상에서와 같이 合成幼若홀몬은 각 기관간의 감수성, 잔존량등에 차이가 있으며, 이에 따른 생리적기능

도 다양할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 누에의 생리적기능에 미치는 合成幼若홀몬의 영향을 究明하기 위한 일환으로, 合成幼若홀몬 투여에 의한 누에의 體液중 蛋白質 및 아미노산의 變化를 조사한 바 얻어진 몇가지 결과를 보고한다.

材料 및 方法

1. 供試蠶品種

본 실험에 사용한 蠶品種은 四星蠶이며, 飼育은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 桑葉으로 하였다.

2. 合成幼若홀몬의 處理

合成幼若홀몬, Methoprene(Isopropyl (2E, 4E)-11-methoxy-3, 7, 11-trimethyl-2, 4-dodecadienoate; 大塚製藥)의 投與量은 누에 體重 1g당 1, $10\mu\text{g}$ 으로 하였고 投與方法은 合成幼若홀몬을 acetone에 溶解하여, 5齡 餉食 후 60시간째 누에의 등면에 micropipette로 塗布하였다.

3. 體液採取

體液은 누에의 꼬리뿔을 잘라 차거운 시험관에 적당량을 採取하였고, 體液의 산화를 방지하기 위해 소량의 phenylthiourea를 첨가하였다. 體液중의 혈구를 제거하기 위하여 1,000g에서 10분간 원심분리를 행한 후 상등액을 試料로 하였으며, 사용할 때까지 -20°C 에서 냉동보관하였다.

4. 蛋白質定量

蛋白質定量은 Lowery et al (1951)의 방법에 준하여 행하였다. 즉 定量은 試料에 alkaline copper용액 3ml를 넣고 잘 섞어 10분간 방치한 후 Folin reagent 0.3 ml를 넣어 30분간 방치하였다가 Spectrophotometer (CE 292, England)로 540nm에서 흡광도를 측정하였

다. 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다.

5. 아미노산의 分析

아미노산의 分析은 $100\mu\text{l}$ 의 體液에 70배(v/v)의 6N HCl을 加한 후 유리봉(직경 10mm, 길이 500mm)에 넣고, 진공상태로 밀봉하여 110°C 에서 24시간 가수분해시켰다. 아미노산의 分析方法은 Spackman et al (1958)의 방법에 따라 자동아미노산 分析器(Hitachi 835-50, Japan)로서 分析하였다.

實驗 結果

1. 5齡期の 幼蟲 經過日數 및 繭質

合成幼若홀몬을 투여한 누에의 5齡幼蟲 經過日數 및 繭質은 表 1과 같다.

5齡期の 幼蟲經過日數는 對照區에 비해 JHA-1區가 1일, JHA-10區가 4일 정도 길었으며, 암수간에는 차이가 없었다.

繭重은 對照區에 비해 JHA-1, JHA-10區가 각각 7%, 21% 증가되었다. 繭層重은 JHA-1區가 5%, JHA-10區가 7% 증가되었으며 繭層比率은 對照區와 JHA-1區는 비슷했으나, JHA-10는 指數로 약 12% 정도 낮았다. 따라서 繭生産效率은 JHA-1區가 비교적 양호한 것으로 생각된다. 또한 암수간의 繭重과 繭層重의 증가는 수컷이 암컷보다 높았다.

2. 體液蛋白質

體液蛋白質의 濃度變化를 그림 1과 그림 2에 암수별로 나타내었다.

蛋白質濃度는 대체로 발육이 진행됨에 따라 증가되었다가 熟蠶때에 근소하게 낮아졌으나 JHA-10區는 오히려 熟蠶때에 最高濃度를 보임으로서 다른 處理區들

Table 1. Effects of JHA on larval duration and cocoon quality.

Treatment	5th larval duration (day : hr)	cocoon quality			
		single cocoon weight (gr.)	cocoon layer weight (cg)	cocoon layer ratio (%)	
Control	female	08 : 00	2.57(100)	62.0(100)	24.1(100)
	male	08 : 00	2.08(100)	57.0(100)	27.4(100)
	mean	08 : 00	2.33(100)	59.5(100)	25.5(100)
JHA-1	female	09 : 00	2.65(103)	63.0(102)	23.8 (99)
	male	09 : 00	2.32(112)	62.5(109)	26.9 (98)
	mean	09 : 00	2.49(107)	62.5(105)	25.1 (98)
JHA-10	female	12 : 00	3.04(118)	65.0(105)	21.4 (89)
	male	12 : 00	2.58(124)	62.0(109)	24.0 (88)
	mean	12 : 00	2.81(121)	63.5(107)	22.6 (88)

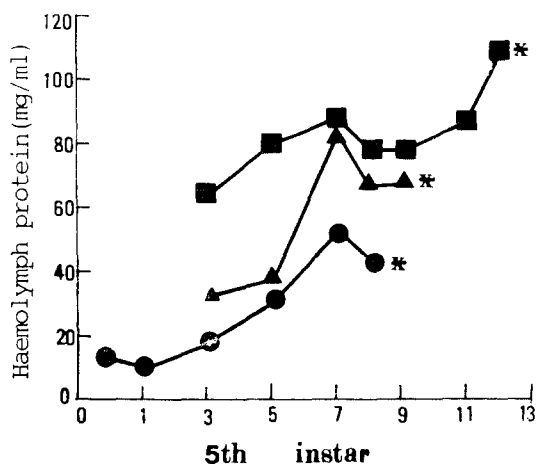


Fig. 1. Concentration of haemolymph protein during developmental stage. (Female)

*: matured larva ●-● Con. ▲-▲ JHA-1
■-■ JHA-10

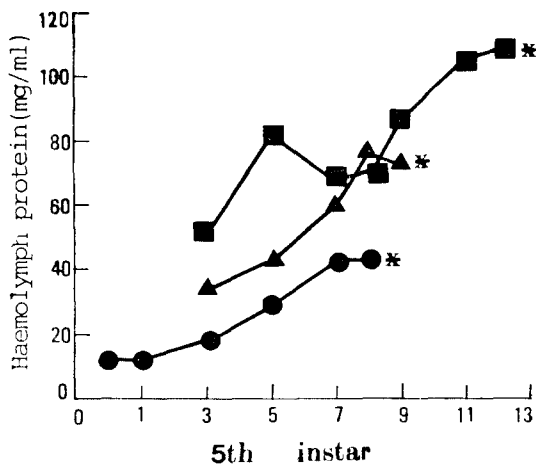


Fig. 2. Concentration of haemolymph protein during developmental stage. (Male)

*: matured larva ●-● Con. ▲-▲ JHA-1
■-■ JHA-10.

과 변화樣相이 다소 달랐다. JHA 投與區들과 對照區의 蛋白質濃度를 비교해 보면 JHA 投與區들이 약 2~3배 정도 높게 나타났다. 특히 이러한 濃度の 증가는 5齡 3日째(合成幼若홀몬투여후 12시간째)부터 나타나기 시작하여 熟蠶때까지 계속되었다. 암수간의 蛋白質濃度は 合成幼若홀몬의 투여에 관계없이 암컷이 수컷

보다 높았다.

3. 體液中 아미노산

吐絲 1日째 누에의 體液에서 分析된 16종의 아미노산양은 表 2와 같다.

對照區에서 대체로 양이 많은 아미노산은 glutamic

Table 2. Effects of JHA on total amino acids in haemolymph at the 1st day after spinning ($\mu\text{g/ml}$)

	Control			JHA-10		
	female	male	mean	female	male	mean
Asp	3,240.5	3,070.0	3,155.3	7,883.2	7,093.8	7,483.5
Thr	1,133.7	1,267.6	1,200.7	2,507.7	2,016.3	2,262.0
Ser	1,544.2	1,415.9	1,480.1	3,746.9	2,448.9	3,097.9
Glu	5,708.8	5,104.1	5,406.5	8,792.7	9,056.7	8,924.7
Gly	1,324.6	997.0	1,160.8	4,160.2	2,911.4	3,535.8
Ala	1,368.0	1,511.7	1,439.9	3,432.3	2,480.0	2,956.2
Val	2,137.2	1,388.8	1,763.0	3,376.2	3,456.0	3,416.1
Met	3,462.3	1,530.6	2,496.5	1,664.5	1,683.5	1,674.0
Ile	1,471.4	1,050.6	1,261.0	2,516.4	2,526.3	2,521.4
Leu	2,075.6	1,866.1	1,970.9	4,482.8	4,279.2	4,381.0
Tyr	3,376.1	938.1	2,157.1	3,916.6	3,849.0	3,882.8
Phe	2,166.8	1,780.1	1,973.5	3,360.4	2,983.4	3,171.9
Lys	3,833.8	2,880.0	3,356.9	5,553.2	5,409.0	5,481.1
His	1,980.6	1,184.1	1,582.4	3,737.0	4,222.1	3,979.6
Arg	1,181.9	849.4	1,015.7	3,643.1	3,295.9	3,469.5
Total	36,005.5	26,834.1	31,420.3	62,763.2	57,711.5	60,237.5

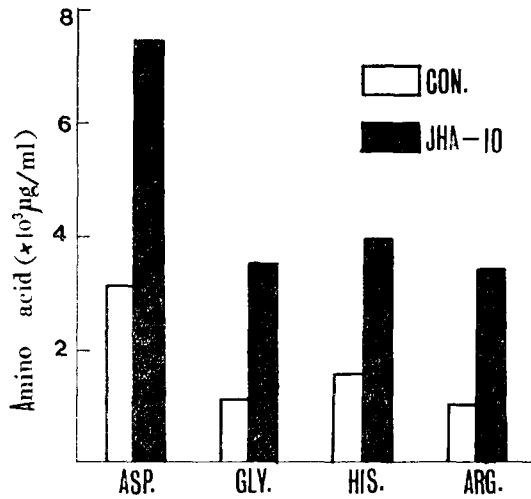


Fig. 3. Comparison of increased levels on aspartic acid, glycine, histidine and arginine.

acid, lysine, aspartic acid 등이었고, 양이 적은 아미노산은 threonine, glycine, arginine 등이었다. JHA-10區에서 양이 많은 아미노산은 對照區와 같았으며 양이 적은 아미노산은 threonine, isoleucine, methionine 등이었다. JHA-10區의 全 아미노산양은 對照區에 비해 약 2배정도 많았으며, 각각의 아미노산양도 전반적으로 증가했다. 合成幼若蠶處理에 의해 증가정도가 높았던 아미노산은 glycine, arginine, histidine, aspartic acid 등이었으며, 특히 對照區에서 함량이 적었던 glycine, 과 arginine은 증가정도가 3배 이상이었다 (그림 3). 압수간의 全 아미노산양은 合成幼若蠶의 투여에 관계없이 암컷이 수컷보다 많았으나, 그 증가정도는 수컷이 암컷보다 다소 높았다.

考 察

幼若蠶은 昆蟲의 成蟲分化를 억제하고 幼蟲形質을 유지시킨다(大瀧; 1971). 누에의 5齡 24시간제에 幼若蠶을 투여하면 食桑期間이 연장되며, 72시간제 과량으로 투여하면 永續幼蟲이 발생하는데 이러한 현상은 幼若蠶과 ecdysone의 양적변동에 기인하며(赤井等; 1973) 體液 중 幼若蠶의 濃度は allata體의 活性, JH 結合蛋白質 및 JH特異 esterase 등에 좌우된다(Goodman; 1985). 본 실험에서도 合成幼若蠶에 의해 5齡 幼蟲期間이 연장된 결과를 나타내었다.

또 본 실험의 결과에서 合成幼若蠶의 투여에 의해 繭重 및 繭層重이 증가되었는데, 이는 幼若蠶이 蠶

體內로 들어가면 中腸, 脂肪體 血液등에 비해 絹絲腺에서 비교적 오랫동안 남아 있으며(島田等; 1981) 또 幼若蠶은 投與蠶의 絹絲腺 細胞는 RNA, DNA 및 fibroin의 合成을 일단 지연시킨 후, 후기에 높은 合成能을 지속시키므로서 網物質의 分비량이 증가되는데(Akai et al; 1971, 倉田·Daillie; 1978) 기인한 것으로 생각된다. 한편 合成幼若蠶 10µg투여의 경우 繭重과 繭層重은 증가하나 繭層比率이 낮아 繭絲生産效率이 불량한 결과를 보였는데, 이는 幼若蠶이 多量으로 投與될 경우 網蛋白質合成 보다는 體組織形成을 위한 蛋白質合成이 더욱 왕성하게 일어나기 때문인 것으로 사료된다.

體液蛋白質은 脂肪體에서 合成되어 體液중으로 방출되며, 體液蛋白質의 濃度は 脂肪體의 蛋白質合成能에 의존된다(Shigematsu; 1958). 重松(1978)은 合成幼若蠶을 과량투여할 경우 體液蛋白質濃도가 현저하게 증가하며, 이것은 幼若蠶이 脂肪體의 蛋白質合成 促進 및 DNA複製를 지속시키기 때문이라고 했다. 또 Tojo et al(1981)은 脂肪體에서 幼若蠶은 成蟲形態形成에 사용되는 저장단백질의 合成을 억제한다고 했다. 본 실험에서 合成幼若蠶은 投與蠶의 體液蛋白質濃度は 2~3배 정도증가 되었고, 투여량이 많으면 蛋白質濃도도 증가하여 重松(1978)의 결과와 유사하였다.

合成幼若蠶 투여 후 12시간제(5齡 3日)에 蛋白質濃도가 급증한 것은 幼若蠶은 대사가 빠르며(Ajami & Riddiford; 1973) 脂肪體內에서의 最大分布量은 體內投與 후 4~8시간이므로(赤井等; 1985) 脂肪體는 이 시기에 蛋白質合成이 促進되어 蛋白質이 體液중으로 방출되었기 때문이다.

Andersen et al(1973)은 *Tenebrio molitor*의 皮膚의 아미노산 조성은 幼若蠶에 의해 변화된다고 했으며, 重松(1978)은 누에에 과량의 合成幼若蠶을 투여하면 全 유리아미노산의 濃도가 증가되고, glycine, ornithine 등의 濃度は 증가하는데 반해 histidine은 저하한다고 했다. 본 실험에서 全 아미노산의 양은 合成幼若蠶에 의해 약 2배 정도 증가되었고, 또 glycine, aspartic acid, arginine 등의 아미노산이 현저한 증가정도를 나타내어 위 보고와 대체로 일치하는 경향이 있었다. 이와 같이 體液중 아미노산의 양적증가는 合成幼若蠶이 體內에서 이용되지 않는 아미노산의 축적을 조장하거나 또는 아미노산 pool의 기능에 異常을 일으키기 때문인 것(伊藤; 1983)으로 생각된다. 그러나 본 실험의 결과는 體液의 총아미노산양이므로 유리아미노산의 지동은 알 수가 없다. 따라서 추후 유리아미노산의 양적변동이 검토되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

누에의 5齡 60시간째 合成幼若홀몬(JHA)을 體重 1g당 1 μ g, 10 μ g을 經皮投與한 후 體液중 蛋白質 및 아미노산의 變動을 조사하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 5齡幼蟲期間은 對照區보다 JHA-1區가 1日, JHA-10區가 4日 연장되었다.
2. 繭重 및 繭層重은 合成幼若홀몬 投與區가 對照區보다 무거웠고 繭層比率는 JHA-10區가 낮았다.
3. 體液蛋白質의 濃度는 合成幼若홀몬投與區가 對照區에 비해 현저하게 증가되었다.
4. 體液중 全 아미노산양은 JHA-10區가 對照區에 비해 약 2배 정도 많았으며, 특히 glycine과 arginine의 증가경도는 현저하다.

引 用 文 獻

- Ajami, A.M. and Riddiford, L.M. (1973) Comparative metabolism of the cecropia juvenile hormone. *J. Insect Physiol.* 19, 635-645.
- Akai, H. and Kiguchi, K. (1971) Increased accumulation of silk protein accompanying JH-induced prolongation of larval life in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera; Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 6(4), 218-220.
- 赤井 弘·木口憲爾·森謙治(1973) 카이코의 成長과 變態에 及ぼす幼若홀몬의 影響. 蠶試報 25(5), 287-305.
- Akai, H. and Kobayashi, M. (1971) Induction of prolonged larval instar by the juvenile hormone in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera; Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.*, 6(3) 138-139.
- 赤井弘·田村俊樹(1985) 幼若홀몬活性物質의 投與後의 蠶體內分布와 排泄. 應動昆 29(1), 85-87.
- Andersen S.O., Chase, A.M. and Willis, J.H. (1973) The amino acid composition of cuticles from *Tenebrio molitor* with special reference to the action of juvenile hormone. *Insect Biochem.* 3, 171-180.
- Chang, C.F., Murakoshi, S. and Tamura, S. (1972) Giant cocoon formation in the silkworm, *Bombyx mori* L., topically treated with methylenedioxyphenil derivatives. *Agri. Biol. Chem.* 36, 692-694.
- Gilbert, L.I. and King, D.S. (1973) Physiology of growth and development: Endocrine aspects. In "The Physiology of Insecta" (Ed. by Rockstein, M.) 1, 250-288, Academic Press, New York and London.
- Goodman, W.G. (1985) Relative haemolymph juvenile hormone binding capacity during larval, pupal and adult development in *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 15, 557-564.
- 伊藤智夫(1983) 蠶의 榮養와 人工飼料. 日本蠶絲新聞社, 28-99.
- 小針要吉·赤井弘(1978) 幼若홀몬劑 "만다"의 投與試驗. 日蠶雜 47(4), 315-319.
- 倉田啓而(1978) 家蠶後部絲腺의 DNA合成에 及ぼす幼若홀몬의 投與時期について. 日蠶雜 47(6), 514-518.
- 倉田啓而·Daillie, J. (1978) 合成幼若홀몬의 家蠶絹絲腺의 發育および絹絲腺의 核酸絹絲蛋白質合成에 及ぼす影響. 蠶試報 27(5), 507-530.
- Lowery, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 馬永一·權寧河·李相豐(1984) 幼若홀몬에 關한 研究 II. 獎勵蠶品種에 對한 合成幼若홀몬 "마니나"의 增蠶效果. 韓蠶誌 26(1), 25-29.
- 馬永一·李相豐·洪起源·孫基旭(1978) 幼若홀몬에 關한 研究 I. 類似合成幼若홀몬 "R-20458"에 對한 增絲效果. 韓蠶誌 20(2), 20-25.
- 室賀明義·中島正雄·青森椋二·小澤洋一·新村正純(1975) 合成幼若홀몬의 育蠶への 利用에 關する 研究. 日蠶雜 44, 267-273.
- 大瀧哲也(1971) 幼若化홀몬의 分泌와 作用. 動雜 80, 71-79.
- Röller, H., Dahm, K.H., Sweeley, C.C. and Jrost, B.M. (1967) The structure of the juvenile hormone. *Angew., Chem.* 6, 179-180.
- Shigematsu, H. (1958) Synthesis of blood protein by fat body in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nature.* 182, 880-882.
- 重松孟(1978) 家蠶의 成長發達에 伴う 主要器官의 成長과 其의 構成成分에 現われた 幼若홀몬의 效果—幼若홀몬過剩投與의 場合—. 日蠶雜, 47(4), 292-300.
- Shigematsu, H. (1982) *In Vitro* Effect of juvenoid on the incorporation activity of labeled precursors into nucleic acids and protein under the incubation

- of the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 51(1), 27-34.
- 島田秀弥・釜田壹・浅野昌司 (1979) 幼若ホルモン活性化合物, Methoprene の育蠶への利用に関する研究, II. チオニンによる生體染色からみた methoprene 處理蠶の絹絲生成の様相. 日蠶雑 48(4), 282-286.
- 島田秀弥・釜田壹・浅野昌司 (1981) 幼若ホルモン活性化合物, methoprene の育蠶への利用に関する研究, III. 家蠶における methoprene の吸収, 分布, 排泄について. 日蠶雑 50(5), 391-395.
- Spackman, D.H., Stein, W.H. and More, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30, 1190-1206.
- Tojo, S., Kiguchi, K., and Kimura, S. (1981) Hormonal control of storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect. Physiol. 27, 491-497.