

## 家蠶 腎臟形卵에 있어서 遺傳子의 發現機構

—특히 未受精卵을 中心으로—

盧時甲\* · 孫海龍 · 坂口 文吾\*

\*九州大學 農學部 · 慶北大學校 農科大學

### Gene Expression of the Kidney Mutant in *Bombyx mori*

—Biochemical Analysis of Yolk Protein and Template Activity of RNA in Unfertilized Egg.

Si Kab Nho\* · Hae Ryong Sohn · Bungo Sakaguchi\*

\*Kyushu University · Kyung Pook National University.

#### Summary

This study was carried out to investigate the elucidation of gene expression in embryo formation of the Kidney mutant, especially yolk proteins in unfertilized eggs and template activity of m-RNA extracted from them.

The results were summarized as follows:

There was no recognized qualitative difference in yolk proteins of unfertilized eggs between the Kidney mutant and normal.

There was not any difference, between Kidney mutant and normal in the molecular species of m-RNA derived from maternal origin with the template activity in vitro.

#### 緒 論

家蠶에는 大卵(*Ge*), 小形卵(*sm*), 第2小形卵(*sm-2*), 退化型小形卵(*sm\**), 紡錘形卵(*sp*), 腎臟形卵(*ki*) 등, 卵의 大小 및 形態에 關한 遺傳的 變異가 대단히 많다. 그 중에서도 鈴木(1932)에 의해 最初로 報告된 腎臟形卵은 卵形이 特異할뿐 아니라 胚子가 異常發育을 하는 등의 特異形質을 갖고있다. 즉 劣性遺傳子 *ki*에 의한 偽母性遺傳의 遺傳樣式을 나타내며, *ki homo*型的 雌蛾가 産卵한 卵은 全部 kidney 形을 나타낸다. 또한, 受精後 形成된 胚子는 中, 內胚葉性 起原의 器官形成은 보이지않고 外胚葉性 起原의 組織器官만이 不完全한 發育을 해 나가다가 孵化하지 못하고 결국 致死하고 단다. 이같은 特異 異常形質을 發現하는 腎臟形卵의 胚子形成에 對하여서는 鈴木·一丸(1955), MIYA(1967) 등에 의해 組織學的 側面에서 觀察 報告되었지만, 이들 異常胚子의 成因 및 致死機構 등에 對해서는 아직도 많은

疑問點이 남아 있다.

一般的으로 昆蟲의 卵과 같은 廢鎖系에서는 胚子의 形成 및 發育 등에 對한 卵內 所藏物質들의 影響은 대단히 크다. 특히 未受精卵의 경우, 卵母細胞內에는 蛋白質을 爲始하여, 糖, 脂質, Amino 酸等 將來의 胚子發育形成에 必要한 素材들과 初期 胚發生過程에 있어서 重要한 役割을 擔當하게 될 母性 由來의 mRNA, rRNA 및 tRNA 등이 具備되어 있다는 事實 등이 最近에 報告되었다(Sander et al 1985) 이들 中에서도 maternal mRNA는 蛹期의 卵形成期 後期에 合成되며, 蛋白質과 結合하여 RNP의 形態로 卵母細胞中에 貯藏 保存된다. 또한 이들 maternal mRNA는 mRNA의 여러 性質中의 하나인 poly(A)部分을 가지며 受精後의 鑄型活性을 나타낸다는 事實 등이 밝혀졌다(Memod et al, 1980; Jäckle, 1979; Jäckle and Kalthoff, 1979).

누에에 있어서는 藤井·河口(1982)가 未受精卵으로부터 RNP顆粒을 抽出, Poly(A)를 가진 RNA를 分離해서 이들 Poly(A) RNA가 無細胞 蛋白質合成系에서

翻譯 활성을 나타내는 mRNA 라는 사실을 確認했다. 그러나 이들 mRNA의 翻譯活性에 關與되는 部分의 動員機構 및 翻譯에 의해 生成된 蛋白質의 胚發生過程에 있어서의 機能的인 役割等 아직도 不明確한 點들이 많다.

著者들은 家蠶의 卵 形成 및 胚子 形成過程에 있어서 遺傳子에 의한 形質發現機構의 解明을 위한 研究의 一環으로 卵形 異常變異體인 腎臟形卵의 未受精卵에 注目, 卵黃 蛋白質의 質的인 面에서의 分析과 未受精卵으로부터 抽出한 高分子狀 RNA의 翻譯活性等에 對해 正常卵과의 比較分析을 實施했다.

本文에 앞서 本實驗의 材料로써 使用한 系統의 育成 및 飼育에 積極的인 協調과 아울러 有益한 助言을 아끼지 않았던 九州大學 家蠶遺傳子實驗施設 土井良 宏 教授에게 깊은 感謝를 드린다,

## 材料 및 方法

供試蠶으로서 九州大學 農學部 家蠶遺傳子實驗施設 保存의 腎臟形卵 系統을 使用했다. 腎臟形卵 遺傳子 *ki*는 第6染色體上의 組換價 8.3에 座位하는 劣性 遺傳子로서, *ki* homo型의 雌蛾가 만드는 卵은 卵形에 있어서는 全部 腎臟形(그림 1)이며, 受精後 形成된 胚子는 孵化하지 못하고 發育 途中에 致死한다. 따라서 腎臟形卵(以下 *ki*卵으로 稱함)은 *+ki/+ki*의 雌蛾로부터, 正常卵은 同一 連關群에 所屬한 *E* 複對立 遺傳子群中에서 優性的 過剩肢 遺傳子 *E<sup>kb</sup>*를 標識遺傳子로 使用한 *E<sup>kb</sup>+/+ki*의 雌蛾로부터 完成卵을 採取했다.

### 1. 可溶性 卵黃蛋白質의 電氣泳動

卵黃中의 可溶性蛋白質을 2次元 電氣泳動法에 의해 分析했다. 즉 完成卵으로부터 卵黃을 採取해 10,000 rpm에서 5分間 遠心分離後 上清液을 電氣泳動 試料로

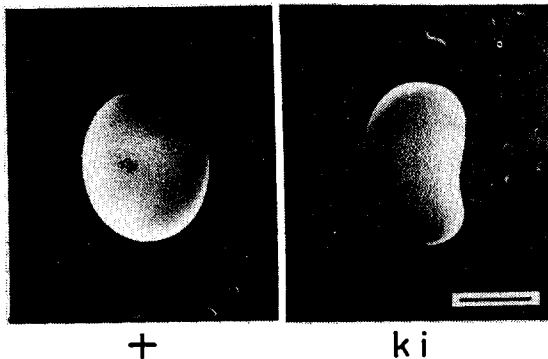


Fig. 1. Pictures of the normal and kidney mutant. Scale indicator 0.5mm  
+ : normal egg *ki* : kidney mutant.

使用했다. 먼저 6.4% Polyacrylamide를 支持體로 한 rod電氣泳動을 實施한 後 泳動이 끝난 Gel을 0.025M Tris, 0.192M Glycine, 0.1%SDS의 溶液中에서 1~2hr (37°C) 平衡化시켰다. 平衡化가 끝난 Gel을 미리 준비해 둔 10% Polyacrylamide SDS Slab Gel에 얹은 후 1% Agarose용액으로 봉해 2次元 電氣泳動을 實施했다. 泳動이 끝난 Gel을 10% TCA에 1hr 固定後, 0.5% CBB\*용액으로 染色했다(Hames and Rickwood, 1981), 分子量의 測定은 同一 條件에서 泳動한 marker protein과의 相對的인 移動度로부터 推定했다.

### 2. RNA의 抽出

腎臟形卵系와 正常卵系의 雌蛾의 卵管으로부터 完成卵을 採取하여 液體窒素로 凍結시킨 後 phenol-chloroform法에 의해 高分子狀 RNA를 抽出했다. 즉 各各의 sample을 粉末狀으로 磨碎한 後, extraction buffer(0.1 M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.01M EDTA, 10% SDS 10 $\mu$ g/ml PVS\*, 10units/ml Na-Heparin, pH9.0)를 가해 잘 섞었다. 여기에 等量의 飽和 phenol을 가해서 10,000rpm, 45分間 遠心分離를 實施했다. 遠心後 얻어진 水層에 等量의 phenol; chloroform; isoamylalcohol(50 : 50 : 1)을 가해 遠心分離시켜 그 水層部가 0.3 M이 되도록 NaCl을 가한 後, 80% ethanol中에서 沈澱시켰다. 이 沈澱部를 모아서 3M Na-acetate, 5mM EDTA(pH5.5)의 溶液으로 DNA 및 低分子 RNA 등을 除去한 後 高分子狀 RNA만을 遠心分離(9,000rpm, 45分間)에 의해 얻었다.

### 3. invitro系에서의 RNA翻譯

放射性 amino酸을 利用한 翻譯活性 實驗은 Pelham and Jackson(1976)의 方法에 準해서 實施했다. 즉, rabbit reticulo-cyte lysate(Amersham社)의 無細胞 蛋白質合成系에 RNA 5 $\mu$ 를 가해 그 위에 10 $\mu$  Ci의 [<sup>35</sup>S]-Methionine(1,170 Ci/mmol, Amersham社)을 加한 後 30°C에서 40分間 反應시켰다. Blank는 RNA의 대신으로 DDW\*\*을 넣은 同一條件의 反應溶液으로 했다. 反應完了後 反應液을 一定量씩 취한 後 TCA 不溶性 分割中의 放射活性值를 Liquid Scintillation Counter (Aloka 1000)을 利用해서 測定했다.

### 4. SDS-Polyacrylamide Gel 電氣泳動 및 Fluorography

SDS-Gel電氣泳動은 Laemmli(1970)의 方法에 準했다. 즉 一定量의 反應液에 SDS-Sample Buffer(1M Tris-HCl(pH6.8), 4% SDS, 23% Glycerol, 1%

\* CBB: Coomassie Brilliant Blue k250

\* PVS: Potassium Polyvinyl Sulfate

\*\* DDW: Double Distilled Water

DTT\*\*\*, 0.02% Bromophenol Blue)을 가해서 37°C, 18hr 可溶化시킨 것을 10% Polyacrylamide SDS-PAGE의 試料로 使用했다. 泳動이 끝난 Gel을 10% TCA 溶液에서 1hr 固定後, 0.1% CBB로 染色했다. 脫色이 끝난 Gel을 EN<sup>3</sup>-HANCE(New England Nuclear社)處理를 한 다음 70~75°C의 hotplate에서 乾燥시켰다. 乾燥된 Gel을 Kodak X-Omat film을 利用해 -80°C에서 5~7日間 露出시킨 後 fluorogram을 作成했다(Lasky and Mills, 1975). 分子量 測定은 marker 蛋白質(Trypsin inhibitor 20100, Lactate dehydrogenase 36500, Glutamate dehydrogenase 55,400, phosphorylaseb 97,400, Boehringer社)을 使用하여 相對的인 泳動距離로부터 推定했다(Shapiro et al 1967, Weber and Osborn, 1969).

### 結果

完成卵의 卵黃成分中の 可溶性 蛋白質을 1次元展開時는 native 電氣泳動法, 2次元展開時는 SDS에 의한 Slab電氣泳動法에 의해 分析한 結果 그림 2에서 보는 바와 같이 正常卵과 *ki*卵에서 各各 約 60個의 spot가 檢出되었다. 이들은 約 200kd(kilo dalton)에서 10kd 範圍의 分子量을 가지며 이중에서도 特히 分子量 200kd 前後, 80~68kd, 27kd, 18kd~10kd 部分의 約 15個가 主要成分으로 나타났다. 따라서 卵黃蛋白質中の 可溶性

\*\*\* DDT: Dithiothreitol

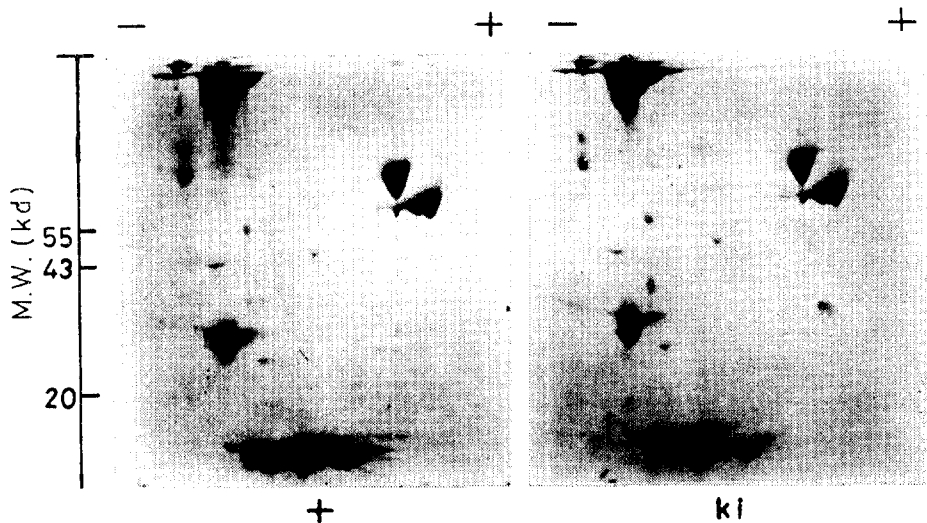


Fig. 2. Two-dimensional electrophoretic pattern of normal and kidney yolk proteins extracted from unfertilized eggs.  
+ : normal egg    *ki* : kidney mutant

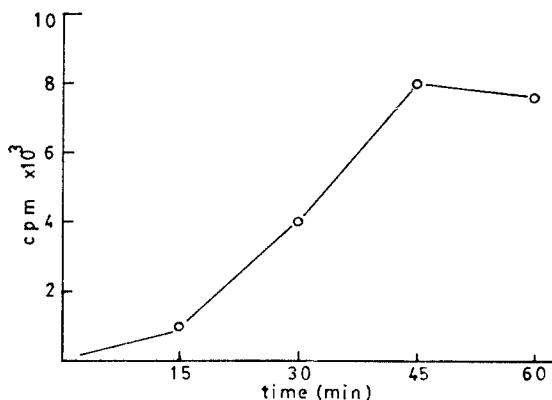


Fig. 3. Time-course of S-Methionine incorporation in the acid-insoluble fraction of the protein.

蛋白質은 主로 이들 約 15의 主要成分에 의해 構成되어 있음이 確認되었다. 또한 正常卵과 *ki*卵의 電氣泳動像은 거의 同一한 pattern으로 이들 蛋白質의 質的인 面에서의 差異는 거의 認定할 수 없었다.

無細胞 蛋白質合成系에 L-[<sup>35</sup>S] Methionine을 가한 後, 酸不溶性 分劃中에 檢出된 放射活性의 經時的 變化는 그림 3에 나타난 바와 같이 酸不溶性 分劃中の incorporation은 反應開時後 45分까지는 急激한 增加를 하지만 45分以後 부터는 조금씩 減少하는 것으로 나타났다. 따라서 本論文의 放射性 amino酸 incorporation 實驗의 反應時間은 40分까지로 設定했다.

正常卵 및 *ki*卵의 未受精卵에 있어서 RNA量과 [<sup>35</sup>S]-

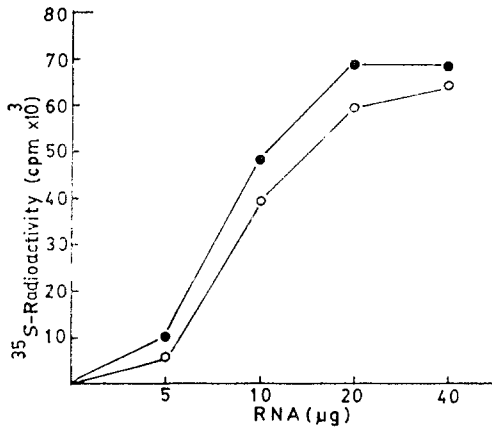


Fig. 4. Template activity of RNA prepared from unfertilized eggs of normal and *ki* mutant.  
○ : normal ○ : kidney mutant.

Methionine의 incorporation과의 關係를 檢討하기 위해 RNA의 量을 5, 10, 20, 40μg씩 使用했으며 最終적으로 lysate의 含量比率이 65%以上이 되도록 調整했다.

그림 4에서 보는 바와같이 反應液中の RNA量에 따른 [<sup>35</sup>S]의 incorporation量의 變化는 投與한 RNA의 量이 增加함에 따라서 incorporation도 急激히 增加했다. 그러나 RNA의 量이 20μg 以上이 되면서 부터는 incorporation의 增加率은 낮아졌다. 또한 [<sup>35</sup>S] incorporation의 增加樣式에 있어서 *ki*卵과 正常卵이 대단히 비슷한 樣相인 것을 알 수 있다.

以上の 結果로서 *ki*卵 未受精卵의 maternal RNA에 는 正常卵과 거의 同一한 翻譯活性能을 가진 母性由來의 mRNA의 存在가 確認되었으며, 正常卵과 *ki*卵 兩者 모두가 높은 翻譯活性能을 가진 것이 밝혀졌다.

이에 上記의 incorporation實驗에 의해 生成된 翻譯產物에 對해서 分析을 實施했다. 즉 maternal mRNA에 의해 translation된 蛋白質의 質的인 면에서의 分析을 行했다. 그림 5는 正常卵과 *ki*卵의 未受精卵으로부터 全 RNA를 抽出, 無細胞 蛋白質合成系에서 翻譯시켜, 生産된 蛋白質(peptide)을 SDS 電氣泳動法에 의해 分析해 作成한 fluorogram이다. 그림 5에 나타난 바와 같이 正常卵, *ki*卵 共히 生成된 蛋白質은 約 24個의 band로 分離되었으며 分子量 約 120kd부터 16kd사이의 것들로 나타났다. 同一 Gel에 泳動시킨 marker蛋白質로부터 算出한 推定分子量으로 87kd, 70kd, 67kd, 62kd, 56kd 53kd, 48kd, 30kd 등의 成分들이 主要 band로서 顯著했다. 한편 lane E에서 48kd의 band가 微量檢出되었으나 이것은 reticulocyte lysate系 그自體에서 由來하는 合成物에 의한 것으로 생각된다.

合成된 蛋白質의 分子量 分布面에서 볼 때 *ki*卵과 正

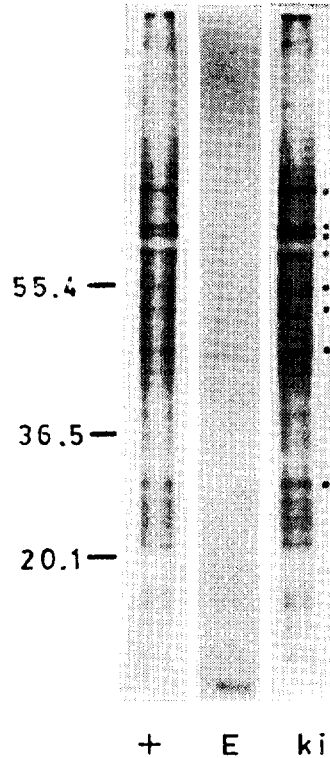


Fig. 5. Fluorography after SDS-PAGE of translation products coded for by *B. mori* RNA in the rabbit reticulocyte lysate system.

Lane +, translation products of RNAs from normal eggs.

Lane *ki*, translation products of RNAs from kidney mutant.

Lane E, endogenous incorporation by the system.

常卵과의 사이에 差異는 거의 認定할 수 없었다. 즉 母體由來 RNA의 無細胞 蛋白質合成系에서의 翻譯活性能을 가진 mRNA의 分子種이 正常卵과 *ki*卵에 있어서 差異가 없다는 것을 말해준다.

## 考 察

一般的으로 未受精卵은 形態的인 變化는 물론이고 代謝變動에 있어서도 거의 變化를 볼 수 없다. 그러나 蛹期の 卵形成期부터 여러 種의 榮養物質들이 體液에서부터 包卵細胞 및 榮養細胞 등으로 流入되어진다. 따라서 未受精卵에는 胚子の 初期發生에 있어서 대단히 重要な 役割을 하게 될 많은 素材가 함유되어 있다고 할 수 있다(kawaguchi, i.Y. and H. Doira, 1974; Tel-

fer. W.H. 1975; Regier. J.C. and F.C. Katatos, 1977) 이들 素材들 中에서도 mRNA, rRNA 및 tRNA 등은 胚初期發生 過程에서 母性由來의 情報因子로서 使用된다는 事實 등이 알려져 있다(Raff. R.A, 1980).

家蠶의 卵形 突然變異系統中 腎臟形卵(*ki*卵)은 卵形에 있어서도 매우 特異한 構造를 나타내고 있으며(盧·坂口, 1984) 胚發生過程에 있어서는 異常胚子를 形成하며 發育後期에는 결국 致死하고 마는 特異한 變異體이다. 異常胚子의 形成에는 母性由來의 素材들과 受精에 의한 胚子由來의 素材들이 關與할 것으로 생각되나 이 中에서도 特히 卵母細胞 由來의 卵黃蛋白質 및 maternal RNA 등은 胚子構築에 있어서 重要한 役割을 할 것으로 생각된다. 따라서 本研究은 *ki*卵의 未受精卵에 注目, 未受精卵의 卵黃蛋白質과 *in vitro* 蛋白質合成系에서 翻譯能을 가진 mRNA의 分子種 등에 關해 正常卵의 그것과 比較 檢討를 통해 그 일부를 解析했다.

*ki*卵의 卵黃蛋白質을 2次元 電氣泳動法에 의해 分析한 結果, 蛋白質의 質의인 面에서 正常卵과의 差異를 거의 認定할 수 없었다. 따라서 初期의 胚發生過程에서 胚子의 形成 및 構築에 利用될 營養物質들 中에 卵黃蛋白質에 있어서는 正常卵과 *ki*卵이 同一한 것으로 推定된다.

抽出한 RNA에 [<sup>35</sup>S]-Methionine을 가한 後 放射性 amino酸의 incorporation을 測定한 結果, 正常卵과 *ki*卵에서 高放射活性을 나타냈다. 또한 RNA 量에 따른 incorporation 增加樣相에 있어서도 正常卵과 *ki*卵이 거의 同一한 상태인 것으로 보아 卵의 母性 mRNA는 正常卵과 差異가 없는 活性能을 가지고 있다고 할 수 있다.

*Xenopus* 등을 使用한 實驗에서 受精 直後의 卵割期에 必要한 蛋白質의 合成은 maternal mRNA의 動員에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으나(鹽川, 1985) 이들 mRNA의 蛋白質合成에 關與하는 機構, 合成蛋白質의 機能的인 役割 및 이들 mRNA의 分子種 등은 매우 흥미로운 課題라고 생각된다. 이에 *ki*卵과 正常卵의 maternal RNA中 無細胞 蛋白質合成系에서 翻譯活性能을 가진 mRNA에 의해 生成된 翻譯產物을 1次元 電氣泳動法에 의해 分析했다. 그 結果, 微量 mRNA 및 *in vitro* 合成系에서 非活性的인 mRNA 등에 對해서는 不確實하지만, *ki*卵의 maternal RNA中 本實驗系에서의 蛋白質合成에 關與하는 mRNA의 情報에는 正常卵과의 比較에서 큰 差異는 없다는 것이 밝혀졌다. 즉 活性化된 mRNA의 分子種에 있어서 *ki*卵과 正常卵은 同一한 것으로 推定된다. 이들 mRNA의 *in vivo*系에서의 活性能, 初期 胚子發生中 時期 特異的인 活性機構 및 合

成蛋白質의 機能的인 役割 등에 關하여는 다음의 報告에서 論及하고자 한다.

## 摘 要

家蠶 腎臟形卵의 胚子形成에 있어서 遺傳子의 發現 機構를 解明하기 위한 研究의 一環으로, 未受精卵 卵黃蛋白質과 未受精卵으로부터 抽出한 RNA의 無細胞蛋白質 合成系에서의 翻譯活性能에 對해 檢討했다.

그 結果, *ki*卵 未受精卵의 卵黃蛋白質은 質의인 面에서 볼때 正常卵과의 差異를 認定할 수 없었다.

또한 *in vitro* 無細胞 蛋白質 合成系에서 翻譯活性能을 가진 母性由來의 mRNA分子種에 있어서도 *ki*卵은 正常卵과의 比較에서 이렇다 할 差異가 없었다.

## 引 用 文 獻

- 藤井 博·河口豊(1982) カイコ未受精卵における母性 mRNAの存在. 日蠶雜 51, 503-509.
- Hames, B.D. and D. Rickwood (1981) Gel electrophoresis of proteins. IRL Press, 189-217.
- Jäckle, H.(1979) Degradation of maternal poly(A)-containing RNA during early embryogenesis of an insect. Wilhelm Rouxs Arch. Entwicklungsmech Org. 187, 179-193.
- Jäckle, H. and K. Kalthoff (1979) RNA and protein synthesis in developing embryos of *Smittia spec.* Wilhelm Rouxs Arch. Entwicklungsmeth Org. 187, 283-305.
- Kawaguchi. Y. and H. Doira (1974) Incorporation and synthesis of protein by the ovaries of *Bombyx mori*. J. Fac. Agr. Kyushu Univ. 18, 139-142.
- Laemml. UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Laskey. R.A and A.D. Mills (1975) Quantitative film detection of H and C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56, 335-341.
- Miya. K. (1967) Some problems on developmental physiology in the silkworm egg. J. Seri. Sci. Jpn. 36, 293-296.
- Memod. J.J, G. Schatz and M. Grippa(1980) Specific control of messenger translation in *Drosophila oocytes* and embryos. Develop. Biol. 75, 177-186.
- 岡時甲·坂口 文吾(1984) カイコ腎臟形卵の卵殼構造

- の解析. 九州蠶絲 15, 54.
- Pelham. H.R.B and R.J Jackson (1976) An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur j. Biochem* 67, 247-256.
- Raff. R.A. 9 (1980) Masked mRNA and the regulation of protein synthesis in egg and embryos. in *cell Biology*. Academic Press. Vol.4, 107-136.
- Regier. J.C and F.C. Kafatos (1977) Absolute rates of protein synthesis in sea urchins with specific activity measurements of radioactive leucine and leucyl-tRNA. *Develop. Biol.* 57, 270-283.
- Sander. K.H.O. Gutzeit and H. Jackle (1985) Insect embryogenesis, morphology, physiology, genetical and molecular aspects in *Comprehensive Insect Physiol. Biochem. and Pharmacology* (Ed. Kerkut. G.A. and L.I. Gilbert). Pergamon Press. Vol. 1, 321-385.
- Shapiro. A.L. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 28, 815-820.
- 鹽川 光一郎(1985) シメガエル卵の分子生物学. 東京大学出版會. 50-67.
- 鈴木 簡一郎(1932) 家蠶における腎臓形卵の遺傳及びその胚子の異常發育について. *日蠶雜* 3(4)317-326.
- 鈴木 簡一郎・一丸學(1955) 家蠶における遺傳的不發生卵の發生學的 研究. *熊大教育學報* 2, 177-197.
- Telfer. W.H. (1957) Development and physiology of the oocyte nurse cell syncytium. *Adv. Insect physiol* 11, 223-320.
- Weber. K. and M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis *J. Biol. chemi.* 244, 4406-4412.