

家蠶의 Vitellogenin에 관한 研究

尹 馨 珠·李 相 夢*·文 在 裕

서울대학교 農科大學·蠶業試驗場*

Studies on the Vitellogenin in the Silkworm, *Bombyx mori*,
Reared with Mulberry Leaves and Artificial Diet

Hyung Joo Yoon, Sang Mong Lee,* Jae Yu Moon

College of Agriculture, Seoul National University

Sericultural Experiment Station, Rural Development Administration*

SUMMARY

In the hemolymph proteins of the silkworm reared with mulberry leaves and artificial diet, electrophoretic patterns of Storage Protein 1 (SP₁) and Vitellogenin(VG), changes of relative concentration of SP₁, JHA effects during the developmental stages, and estimation of the molecular weight of vitellin subunits were investigated in the present study.

1. Storage Protein 1 (SP₁) showed female specificity from the middle stage of the fifth instar to the end of spinning stage in the silkworm reared with mulberry leaves and artificial diet.
2. Vitellogenin (VG) showed female specificity just after pupation in the silkworm reared with mulberry leaves and artificial diet.
3. Storage Protein 2 (SP₂) without female specificity was detected from the early stage of the fifth instar to the first or second day after pupation.
4. Vitellin was composed of two non-identical subunits (vitellin-heavy chain; VTL-H, vitellin-light chain; VTL-L) with molecular weight of 186,000 and 41,000.

Also, there were no differences between the molecular weights of vitellin subunits obtained from silkworms reared with mulberry leaves and artificial diet.

5. Relative concentration of Storage Protein 1 (SP₁) after topical application—0, 5, and 10 μ g per body weight—of JHA on the 60th hour of the fifth instar showed the highest increase with the treatment of 5 μ g and a higher increase with the treatment of 10 μ g compared with the control (no topical application of JHA).

I. 緒 論

vitellogenin은 肝 또는 脂肪體에서 合成되어 卵母細胞로 轉移된 후 卵黃主要蛋白質(vitellin)로 되는 體液蛋白質에 붙여진 일반적 명칭으로, 雌特異性이었다 (Pan *et al.*, 1969).

昆蟲의 vitellogenin에 관해서는 cecropia蠶(*Hyalophora cecropia*)의 雌蛹의 體液에 雌特異蛋白質이 존재한다는 것이 처음으로 보고된 이래 (Telfer & Williams, 1953; Telfer, 1954), 다른 昆蟲의 體液에서도 이러한 雌特異蛋白質의 존재가 확인되었다 (Coles, 1965; Engelmann, 1965; 1969; Bodnaryk & Morrison, 1968; Bell, 1969; 1970; Wilkens, 1969; De loof *et al.*

1969).

稻種(1954)은 누에의 體液중에는 前蛹期에만 출현하는 雌特異蛋白質이 존재한다고 하였으며 鮎澤 등(1960)도 누에의 成蟲分化에 따른 體液蛋白質의 變動을 濾紙電氣泳動法으로 추적하여 雌特異蛋白質의 존재를 보고하였다. 그 후 Shigematsu(1958)는 雌特異蛋白質 및 대부분의 體液蛋白質이 脂肪體에서 合成된 후 體液中으로 分泌되는 것을 보고함으로써 昆蟲에 있어서 體液蛋白質의 合成場所를 처음으로 실증하였다.

哺乳類와 鳥類의 vitellogenin은 肝에서 合成되어 體液中에 放出된 후 卵黃主要蛋白質(vitellin)로 되나(Bergink & Wallace, 1974; Tata, 1976; Greengard et al., 1965; Mullinix et al., 1976; Deeley et al., 1975), 昆蟲의 vitellogenin은 脂肪體에서 合成되어 體液中에 放出된 후 包卵皮膜細胞의 間隔을 통하여 卵母細胞에 축적되어 卵黃主要蛋白質(vitellin)로 된다(Pan et al., 1969; Brookes, 1969; Engelmann, 1969; 1971; 1974; Engelmann & Laddwahetty, 1974; Doira & Kawaguchi, 1972; Ono et al., 1975).

일반적으로 昆蟲의 vitellogenin은 成蟲의 體液中에 檢出되지만(Wyatt & Pan, 1978), 누에에서는 예외적으로 蛹體液中에 檢出된다(Ono et al., 1975). 이와같은 現狀은 누에의 경우 vitellogenin은 化蛹開始時期부터 脂肪體에서 그 合成이 시작되어 蛹齡이 경과함에 따라 蛹體液中으로 放出되므로 成蟲이 아닌 蛹期間中の 體液에서 vitellogenin이 檢出되는 것이다.

vitellogenin의 分離·精製에 대한 研究를 살펴보면, Chino 등(1969; 1976)은 eri 蠶(*Philosamia cynthia*)의 雌蛹體液에서 lipoprotein I과 lipoprotein II(vitellogenin)을 精製하였고, 井口·中井(1978)은 누에의 vitellogenin에는 分子量 및 아미노산組成이 다른 2가지 成分의 蛋白質(H鎖; 分子量 142,000, L鎖; 分子量 46,500)이 존재함을 보고 하였다. 한편, Izumi & Tomino(1980)도 vitellin의 分子量이 440,000이며 分子量이 다른 2개의 subunit(H鎖; 分子量 180,000, L鎖; 分子量 42,000)로 구성되어 있음을 보고하였다.

vitellogenin과 밀접한 관계가 있는 貯藏蛋白質(Storage Protein)에 관하여 살펴보면, 昆蟲의 體液中에 존재하는 貯藏蛋白質은 Munn(1969; 1971)에 의해 파리(*Calliphora erythrocephala*)에서 처음으로 발견된 이후 누에에서도 그 존재(Storage Protein 1, 2; SP₁, SP₂)가 보고되었고(Tojo et al., 1980) 특히, SP₁은 性特異성이 있다. 한편, 이들 貯藏蛋白質의 變動을 살펴보면 體液中의 濃도가 5령 初期부터 增加하기 시작하여 吐絲開始期를 頂點으로 減少함과 동시에 脂肪體中

에는 貯藏蛋白質의 濃도가 增加한다(Tojo et al., 1980).

蛹期間中에 雌의 脂肪體의 主要蛋白質은 貯藏蛋白質→小分子 lipoprotein→vitellogenin 순서로 體液中에 放出된다(Ono et al., 1975). 특히 5령 幼蟲期와 蛹期에는 SP₁의 合成과 vitellogenin의 合成은 밀접한 관계가 있어서 SP₁의 合成이 높으면 vitellogenin의 合成도 높고 SP₁을 合成하지 않는 個體는 vitellogenin도 合成하지 않는다(Mine et al., 1983).

昆蟲에 있어서 vitellogenin과 hormone과의 관계를 살펴보면, 많은 昆蟲에 있어서 vitellogenin 合成은 JH 影響下에 있으며(Koppe & Offengand, 1975; Pan & Wyatt, 1976; Chen et al., 1976; Engelmann, 1979; Dejmaj et al., 1972; Brookes, 1969), 또한 몇몇의 昆蟲은 ecdysone에 의해서 vitellogenin의 合成이 지배되어 진다(Fallon et al., 1974; Huybrechts & De loof, 1977). JH는 *Leucophaea maderae*에서 性特異蛋白質과 非性特異蛋白質의 合成을 지배하며(Engelmann, 1969), vitellogenin의 包卵皮膜細胞(follicle cell)에 대한 膜透過性を 조절한다(Koppe et al., 1980a). *Oncopeltus fasciatus* 및 *Nauphoeta cinerea*에 JHA(Juvenile Hormone Analogue)를 局部塗布處理하던 絶食 및 休眠中の 雌成蟲이라도 vitellogenin의 合成이 再開되나 卵發育은 완전히 회복되지 않는다(Thomas et al., 1976; Georges, 1976).

桑葉育蠶과 人工飼料育蠶은 生理的인 면에서 差異가 많은데, 특히 消化液中의 赤色螢光蛋白質과 血液의 遊離아미노산 組成등에서 그 差異를 잘 알 수 있다. 桑葉育蠶의 消化液中에는 누에의 體内に 들어온 바이러스를 不活性化시키는 物質인 赤色螢光蛋白質이 다량 존재하지만, 甞食粉末이 첨가되지 않은 人工飼料로 飼育한 누에의 消化液중에는 이 蛋白質이 거의 존재하지 않는다(林屋 등, 1976). 또한 昆蟲體液의 遊離아미노산도 飼料에 따라 많은 影響을 받는다고 하였다(井口, 1971; Auclair, 1959; Durzan et al., 1968; Villeneave, 1962).

누에등 昆蟲에 있어서 vitellogenin 및 vitellin이 分離·精製되어 그 化學的 性狀 및 그 特性이 밝혀지고 있지만, 飼料條件등과 관련해서 研究된 것은 거의 없는 실정이다.

따라서 本 研究에서는 桑葉 또는 人工飼料에 의해서 누에를 飼育하였을 때 누에 體液蛋白質의 質的 또는 量的으로 差異가 날 것을 생각하여 누에의 體液蛋白質의 인종인 貯藏蛋白質과 vitellogenin에 대해 發育時期別 消長, 血中濃度の 差異, 體液中의 貯藏蛋白質量에 미치는 JHA의 效果, 卵黃主要蛋白質(vitellin)의 分離

및 그 분자량을推定하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試 누에 品種

本 實驗에는 1代 交雜種 七寶蠶(蠶107×蠶108)을 使用하였다.

2. 供試누에의 飼育

桑葉育은 '86年 春蠶期에 서울農大 蠶室에서 標準飼育方法에 準하여 飼育하였으며 人工飼料育은 甞일粉末이 함유되어 있는 人工飼料(東邦油糧(株)에서 구입)를 사용하여 蠶業試驗場 人工飼料育 蠶室에서 飼育하였으며 그 飼育條件은 表 1과 같다.

表 1. 人工飼料育蠶의 齡別 飼育 溫·濕度

齡別(齡)	溫度(°C)	濕度(% : RH)
1	29~30	90
2	28~29	90
3	27~28	85
4	25~26	80
5	25~26	80

3. 試料採取

體液은 5령 4, 6, 8, 吐絲 2일 및 化蛹 1, 2, 3일째에 雌雄別로 각각 10마리씩 疋당량을 채취하였다. 體液의 酸化(melanization)를 방지하기 위하여 소량의 phenylthiourea를 添加하였으며 蛋白質의 成分變化를 방지하기 위하여 얼음이 든 용기내에서 體液을 채취하였다. 채취한 體液을 4,000rpm에서 15분간 冷凍遠心分離하여 血球를 제거한 후 該 上등액을 사용시까지 20°C에 冷凍保管하였다.

卵은 成蟲化적후의 누에나방을 해부하여 卵管을 채취한 뒤 PBS(phosphate buffered saline) 완충액으로 卵管에 붙어있는 不純物을 제거한 후 -70°C에 凍結保管하였다. 사용시는 미리 동결된 유발에 3g의 卵과 30ml의 PBS 완충액을 넣어 5~10분간 마쇄한 후 遠心分離(30,000g, 10분)한 上등액을 電氣泳動用試料로 使用하였다.

4. 電氣泳動

가. Polyacrylamide slab gel 電氣泳動

Davis(1964) 方法에 準하여 行하였으며, 分離겔의 濃度는 7.5%였고 slab gel의 規格은 135×130×2mm 였다.

泳動用 試料는 體液 100 μ l에 40% sucrose 1ml와 소량의 BPB(bromophenol blue)를 잘 섞은 混合液으로 하였으며 電氣泳動時는 試料溝당 20 μ l를 分注하였다.

泳動은 Tris-Hcl glycine 완충액(pH8.4) 中에서 濃縮겔에 對해서는 30mA, 分離겔에 對해서는 20mA의 定電流를 通電하여 냉장고 안에서 4시간 정도 行하였으며, BPB가 泳動槽의 陽極끝으로부터 約 1cm정도 이르렀을때 泳動을 完了하였다. 0.05% coomassie brilliant blue R-250을 染色液으로, 7% 초산액을 脫色液으로 각각 使用하였으며 실온에서 3~4일간 탈색 後 사진촬영 하였다.

나. SDS-polyacrylamide slab gel 電氣泳動

Laemmli(1970) 方法에 準하여 行하였으며 使用한 slab gel의 濃度는 10% 및 12.5%였다. 泳動用 試料는 體液 0.2ml에 40% sucrose 2ml, 8M urea 및 2% SDS를 함유한 0.8ml의 0.2M tris-Hcl 완충액(pH8.4)을 加하고 다시 5% β -mercaptoethanol 10 μ l를 添加하여 밀봉하에서 15분간 끓여 S-S結合을 還元한 것을 使用하였다. 또한, 卵蛋白質과 marker protein도 같은 방법으로 처리하였다. gel은 作成후, 約 1시간정도 예비 通電한 다음, 試料溝당 조제된 體液 40 μ l, 卵蛋白質 60 μ l, marker protein 10 μ l를 각각 分注하였다. 電氣 泳動은 실온에서 pH8.3의 Tris-Hcl glycine 완충액 (0.25M Tris, 1.92M glycine, 1% SDS) 中에서 濃縮 겔에 對해 30mA, 分離겔에 對해 20mA의 定電流를 通電하여 5시간동안 行하였다. 영동후, gel을 染色液 (methanol : acetic acid : 증류수=5 : 1 : 5에 coomassie brilliant blue가 1%)에서 5시간동안 염색한 後 7% acetic acid에서 탈색하였다.

5. 卵蛋白質의 分子량 推定

高分子 蛋白質의 分子량을 추정하기 위하여, thyroglobulin(分子량 ; 330,000), ferritin (分子량 ; subunit 220,000), bovine serum albumin(分子량 ; 67,000), catalase(分子량 ; 60,000), lactate dehydrogenase(分子량 ; 36,000), ferritin(分子량 ; subunit 18,500)를, 低分子 蛋白質의 分子량을 추정하기 위하여는 phosphor-ylase-b(分子량 ; 94,000), bovine serum albumin(分子량 ; 67,000), ovalbumin(分子량 ; 43,000), carbonic anhydrase(分子량 ; 30,000), soybean trypsin inhibitor (分子량 ; 20,000), lactalbumin(分子량 ; 14,400)를 각각 標準蛋白質(calibration kit; Pharmacia Fine Chemicals 제품)로 使用하였다.

6. 合成幼若홀몬(methoprene)의 處理

使用한 合成幼若홀몬은 日本의 大塚製藥(株)에서 제조한 Manta[®] (1.25mg/ml의 methoprene; Isopropyl (2E, 4E)-11-methyl-3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoate)를 acetone으로 최종 methoprene 濃도가 1mg/ml 가 되도록 희석하여 使用하였다. 合成幼若홀몬의 處理

는 5령 餵食 후 60시간째에 누에의 흉부등면에 micro-syringe로 局所塗布(topical application) 하였으며, 처리양 의 손실을 막기 위하여 누에를 ethylether에 30초간 파 취시킨 후 처리하였다. 塗布량은 누에 體重 g당 5 μ g, 10 μ g이었고 對照區는 5ml증류수를 acetone으로 희석 한 다음 5 μ g을 처리하였다. 이와같이 처리한 누에로 부터 5령 4, 6, 8, 吐絲 2일째에 體液을 채취(재료 및 방 법참조)하여 電氣泳動用 試料로 하였으며, 泳動終了 후, densitometer(Gelman, America, 525nm)에 의해 누에 의 體液中的 貯藏 蛋白質의 相對의 濃度を 측정하여 處理別로 비교분석하였다.

III. 實驗結果

1. 누에의 幼蟲 體液中的 貯藏蛋白質(SP₁, SP₂)의 檢出

桑葉과 人工飼料로 사육한 누에의 幼蟲體液蛋白質의 電氣泳動像을 보면

5령 누에의 發育에 따른 貯藏蛋白質의 消長은, 桑葉 育蠶의 경우 (그림 1), 貯藏蛋白質 SP₁은 5령 4일까지 는 雌特異性을 보이지 않으나, 5령 6일째부터는 雌特異

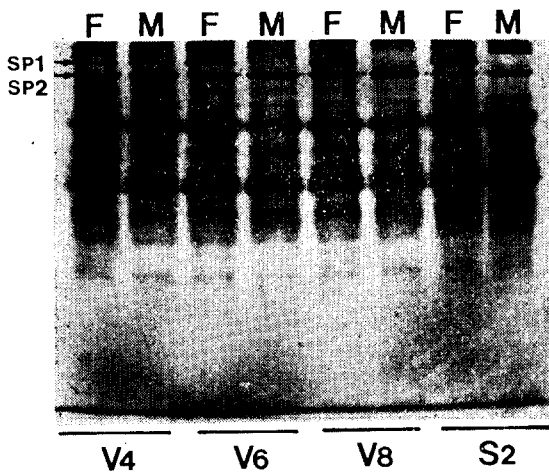


Fig. 1. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of the silkworm fed on mulberry leaves. F, female; M, male; SP₁, storage protein 1; SP₂, storage protein 2. V4, four days after the fourth larval ecdysis; V6, six days after the fourth larval ecdysis; V8, eight days after the fourth larval ecdysis; S2, two days after the initiation of spinning. For separation gel, 7.5% acrylamide was polymerized in Tris-HCl glycine buffer (pH 8.6). Also the proteins electrophoresed were stained with coomassie brilliant blue R-250.

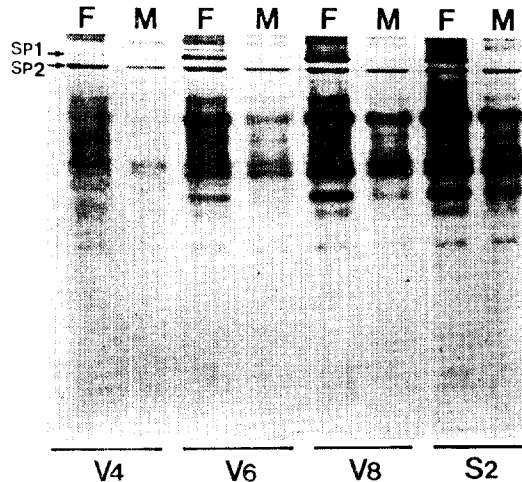


Fig. 2. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of the silkworm fed on artificial diet. For legend, see Fig. 1.

性을 보이기 시작하며, 吐絲 2일째까지 그 特異性을 유지하고 있다. 이 雌特異性이 있는 SP₁ 蛋白質의 量은 5령 雌幼蟲에서 발육이 진전될수록 漸增하였다. 雄幼蟲의 경우, 貯藏蛋白質 SP₁은 5령 4일까지는 檢出되나 5령 6일째 이후부터는 전혀 檢出되지 않았다.

貯藏蛋白質 SP₂의 電氣泳動像은 性特異성이 認定되

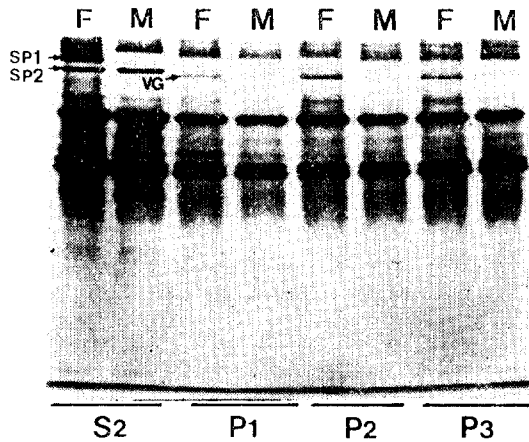


Fig. 3. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of the silkworm fed on mulberry leaves. F, female; M, male; SP₁, storage protein 1; SP₂, storage protein 2; VG, vitellogenin; S₂, two days after the initiation of spinning; P₁, one day after pupation; P₂, two days after pupation; P₃, three days after pupation.

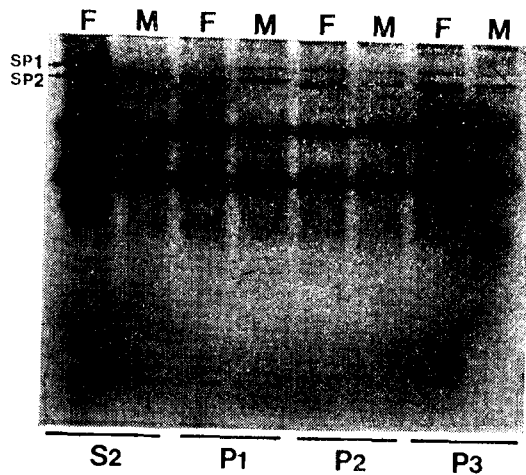


Fig. 4. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of the silkworm fed on artificial diet. For legend, see Fig. 3.

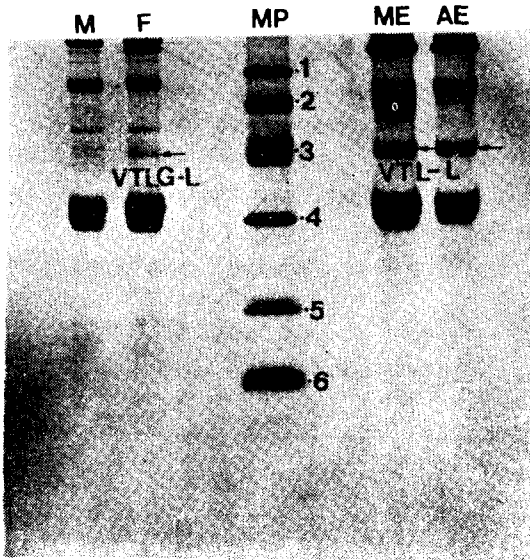


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electropherogram of pupal hemolymph and egg proteins to determine the molecular weight of vitellin-light chain (VTL-L). M, male; F, female; MP, marker proteins; ME, egg proteins of silkworms reared with mulberry leaves; AE, egg proteins of silkworms fed on artificial diet; VTLG-L, vitellogenin-light chain; VTL-L, vitellin-light chain. 1. phosphorylase b (mol. wt 94,000); 2. bovine serum albumin (mol. wt 67,000); 3. ovalbumin (mol. wt 43,000); 4. carbonic anhydrase (mol. wt 30,000); 5. soybean trypsin inhibitor (mol. wt 20,000); 6. lactalbumin (mol. wt 14,400). 12.5% SDS-gels were used, and the proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250.

지 않고 發育에 따른 量에도 差異를 보이지 않았다.

한편, 人工飼料育蠶의 경우 (그림 2), 貯藏蛋白質 SP₁은 桑葉育蠶보다 2일 빠른 5령 4일째부터 雌特異性을 나타내기 시작하여, 吐絲 2일째까지 그 特異性을 유지하고 있고 發育에 따라 量도 漸增했다.

貯藏蛋白質 SP₂는 桑葉育蠶에 있어서와 같이 性特異性이 없었다. 특히 桑葉育蠶의 體液蛋白質은 人工飼料育蠶의 體液蛋白質에서는 檢출되지 않은 SP₁과 SP₂ 밴드 사이에 단백질 밴드를 하나 더 가지고 있다. 이러한 현상은 飼料條件과 밀접하게 관련되는 것으로 생각되며, 이는 후후 연구결과 되어야 할 것으로 생각된다.

2. 누에번데기 體液中的 Vitellogenin의 檢出

桑葉育蠶 (그림 3) 및 人工飼料育蠶 (그림 4) 다같이, 化蛹 1일째 (P₁)가 되면, 5령 中期부터 吐絲 2일째까지 雌特異적으로 檢出되었던 貯藏蛋白質 SP₁은 거의 檢出되지 않고, 반면에 새로운 蛋白質, vitellogenin (VG)이 化蛹 1일째부터 암번데기의 體液에서만, 雌特異적으로 檢出되었다. 그러므로 vitellogenin도 貯藏蛋白質 SP₁과 마찬가지로 雌特異性을 가지고 있다고 보겠다. 이 vitellogenin은 化蛹 1일째부터 發育이 진전됨에 따라, 合成量이 漸增했다. 貯藏蛋白質 SP₂는 桑葉

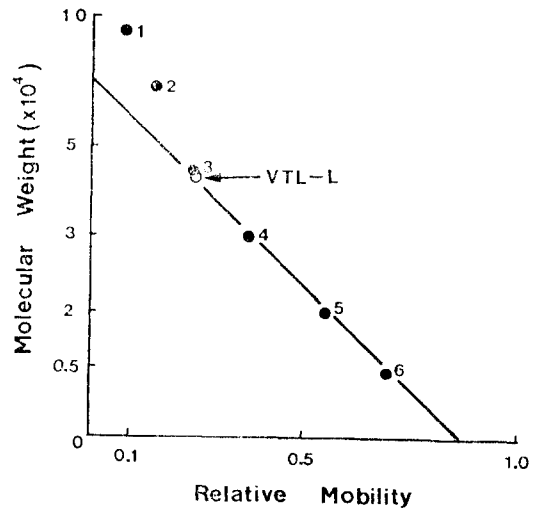


Fig. 6. Determination of vitellin-light chain (VTL-L) molecular weight of female specific protein. Each 10 μ g of marker proteins (for details, see Fig. 5) was electrophoresed in the SDS-gel system of Laemmli (1970) using 12.5% acrylamide gels. The mobility of each protein relative to that of tracking dye was plotted against molecular weight.

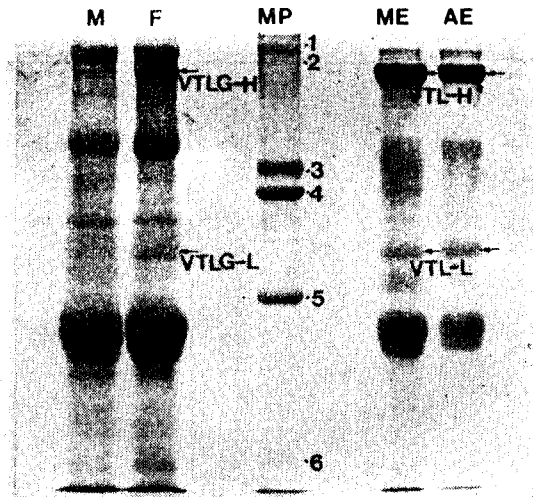


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electropherogram of pupal hemolymph and egg proteins of the silkworm to determine the molecular weight of vitellin-heavy chain (VTL-H). M, male pupae; F, female pupae; MP, marker proteins; ME, egg proteins of silkworm reared with mulberry leaves; AE, egg proteins of silkworm fed on artificial diet; VTLG-H, vitellogenin-heavy chain; VTLG-L, vitellogenin-light chain; VTL-H, vitellin-heavy chain; VTL-L, vitellin-light chain. 1. thyroglobulin (mol. wt 330,000); 2. ferritin (subunit mol. wt 220,000); 3. bovine serum albumin (mol. wt 67,000); 4. catalase (mol. wt 60,000); 5. lactate dehydrogenase (mol. wt 36,000); 6. ferritin (subunit mol. wt 18,500). 10% SDS-gel was used and the proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250.

育蠶의 경우, 吐絲 2일째(S₂)까지 암·수누에서 다같이 檢出되었으나, 化蛹 1일째부터는 거의 檢出되지 않았다. 그러나 人工飼料育蠶의 경우, 貯藏蛋白質 SP₂는 桑葉育蠶보다 1일 늦은 化蛹 1일째까지는 다량 檢出되고, 化蛹 2일째부터는 흔적정도로 檢出되었다. 따라서 桑葉育蠶이나 人工飼料育蠶 다같이 SP₁이 消滅되는 時期는 化蛹 1일째로, SP₁의 消滅과 동시에 vitellogenin이 세포이 出現하는 시기와 一致하였다. 한편, SP₂의 消滅時期는 桑葉育蠶에서는, 化蛹 1일째, 人工飼料育蠶에서는, 化蛹 2일째로 人工飼料育蠶이 약 1일 늦었다.

3. 卵黃主要蛋白質(vitellin)의 分子量 推定

本 實驗의 電氣泳動結果 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶에 있어서 幼蟲體液中的 雌特異蛋白質, 즉 SP₁의 消長

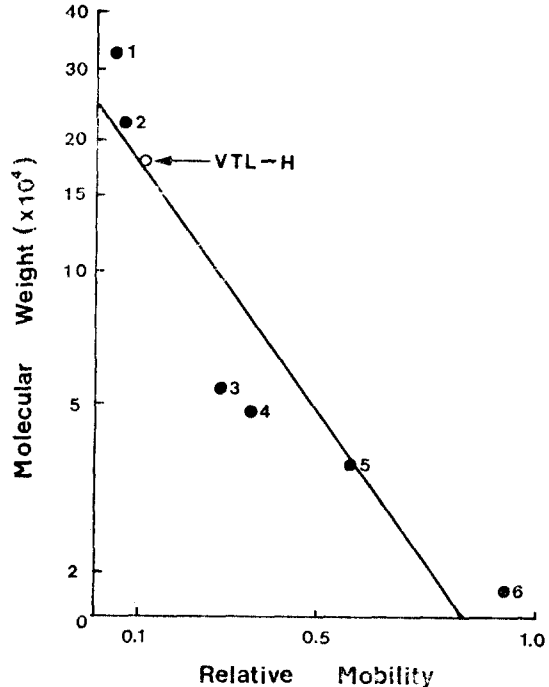


Fig. 8. Determination of vitellin-heavy chain (VTL-H) molecular weight of female specific protein. Each 10ul of marker proteins were electrophoresed in the SDS gel system of Laemmli (1970) using 10% acrylamide gels. Proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250. The mobility of each protein relative to that of tracking dye was plotted against molecular weight. For details, see Fig. 7.

時期는 거의 비슷하며, 電氣泳動的인 移動度도 서로 차이가 없었다. 또한, 번데기時期의 雌特異蛋白質인 vitellogenin의 出現時期 및 電氣泳動的인 移動度도 양자간에 차이가 없었다. 따라서, vitellogenin의 最終產物인 卵 vitellin의 subunit의 分子量도 차이가 없는 지를 알 고지 SDS-PAGE에 의해 그 分子量을 推定하였다.

가. Vitellin-light chain (VTL-L)의 分子量 推定

VTL-L의 分子量을 推定하기 위하여 12.5%의 SDS-slab gel system을 사용하였으며, 그 泳動像은 그림 5와 같다.

桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶의 VTL-L은 電氣泳動像에서 그 移動度가 다같이 0.25로써 서로 같고, 標準蛋白質인 ovalbumin(分子量; 43,000)보다 移動度가 약간 빨랐다. 그림 5의 電氣泳動像의 각 蛋白質의 移動度에 대한 log 分子量의 값을 계산하여 分子量 推定을 위한 標準그래프를 作成(그림 6) 해서, $y = -1.0215x + 4.8869$

의 方程式을 얻었다. 이 式에 VTL-L의 R_f 치인 0.25를 代入하여 分子量의 log치를 計算, 이것을 逆算한 結果, 그 分子量은 41,000으로 推定되었다.

나. Vitellin-heavy chain (VTL-H)의 分子量 推定
 桑葉育蠶 및 人工飼料 育蠶의 蠶卵에서 추출한 vitellin H鎖의 分子量推定에는 10%의 SDS-slab gel system을 사용하였으며, 그 泳動像은 그림 7과 같다.

vitellogenin과 vitellin은 脂質含量에서는 약간의 차 이가 있으나, 그 polypeptide 基本構造에 關係서는 차이가 없 어(泉·富野, 1976; Izumi *et al.*, 1980b), 蛋白質 的 電氣泳動像에도 차이가 없 다는 事實에 근거하여 體 液中 VTLG-H 밴드의 위치에 檢出된 卵 蛋白質밴드 (ME 및 AE의 VTL-H)를 vitellin의 H鎖로 생각 하였 다. 이 VTL-H는 標準蛋白質인 subunit ferritin(分子量; 220,000)보다 약간 빠르게 移動하였으므로, 그 移動 度(R_f)는 0.083이었다. VTL-H의 分子量推定을 爲 해, 그림 7의 標準蛋白質의 移動도에 對한 log分子量 값을 計算하여 標準그래프를 作成하였다(그림 8). 그림 8에서 分子量推定을 爲한 方程式은 $y = -1.331x + 5.380$ 이

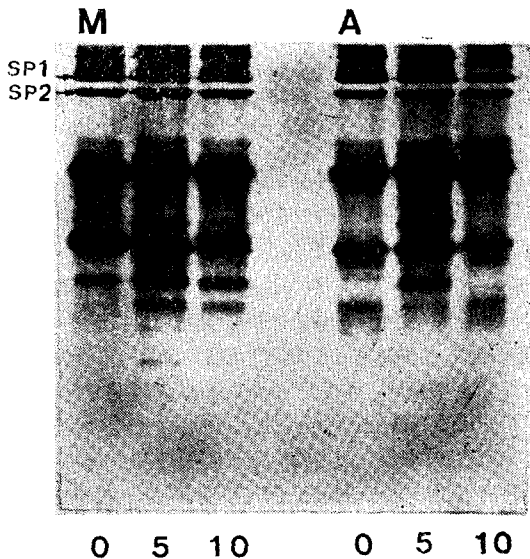


Fig. 9. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of four days-old larvae in the fifth instar silkworm treated with Juvenile Hormone Analogue (JHA), methoprene, on the 60th hour after the fourth larval ecdysis. M, silkworm reared with mulberry leaves; A, silkworm fed on artificial diet; SP₁, storage protein 1. SP₂, storage protein 2. The numbers, 0, 5, 10 in the figure shows micro gram in volume of topical application, respectively.

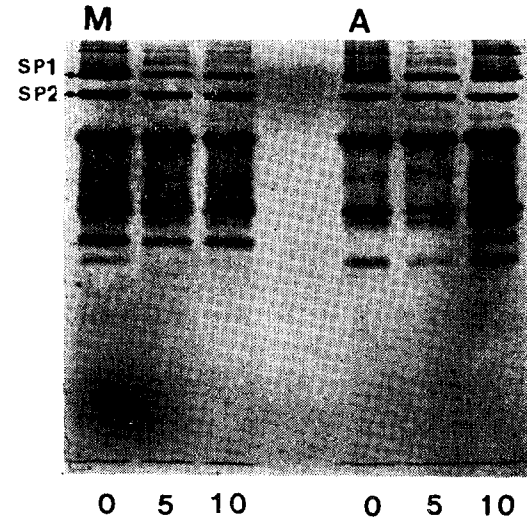


Fig. 10. Polyacrylamide gel electropherogram of six days-old larval hemolymph proteins in the fifth instar silkworm. For legend, see Fig. 9.

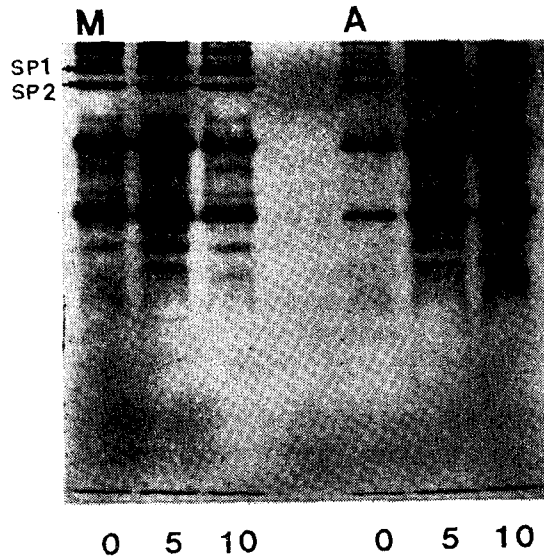


Fig. 11. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of 8 days-old larvae in the fifth instar silkworm treated with Juvenile Hormone Analogue (JHA), methoprene, on the 60th hour after the fourth larval ecdysis. For legend, see Fig. 9.

었다. 이 式에 VTL-H의 移動도를 代入, log 값을 計算한 후, 그것에 對한 分子量을 逆算하면, VTL-H의 分子量은 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶 各 186,000으로 推定되었다.

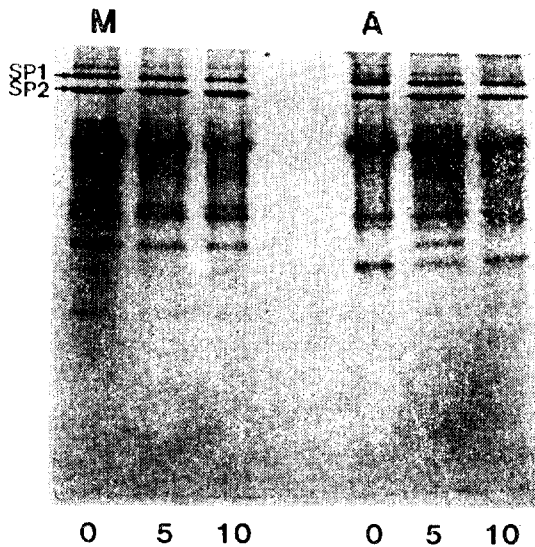


Fig. 12. Polyacrylamide gel electropherogram of hemolymph proteins of 2 days-old larvae after the initiation of spinning. For legend, see Fig. 9.

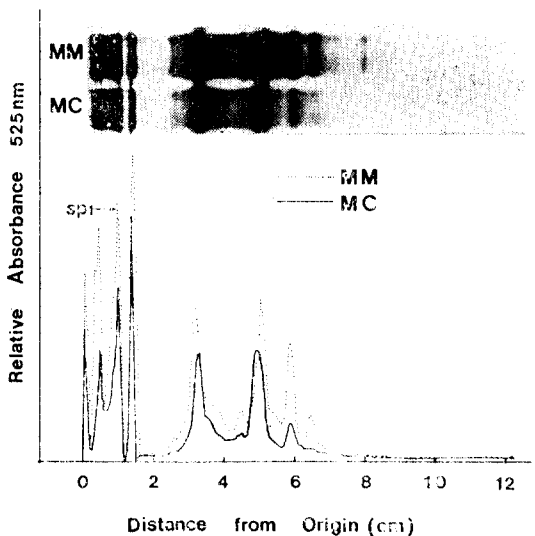


Fig. 13. A densitometric analysis of larval hemolymph proteins in the silkworm treated topically with Juvenile Hormone Analogue (JHA), methoprene, on 60th hour after the fourth larval ecdysis. ...MM, topical application ($5 \mu\text{g}$) of JHA; ---MC, no topical application of JHA (control); SP₁, storage protein 1. In the figure, the hemolymph proteins of 2 days-old larvae after the initiation of spinning were analyzed and the silkworm was reared with mulberry leaves during the period of larval stage.

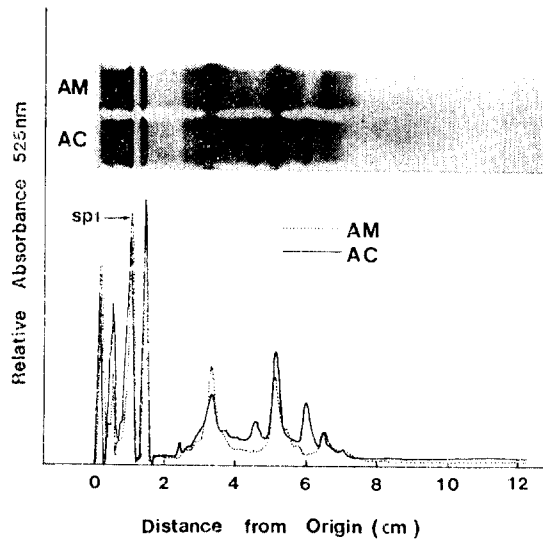


Fig. 14. A densitometric analysis of larval hemolymph proteins in the silkworm treated topically with Juvenile Hormone Analogue (JHA), methoprene, on the 60th hour after the fourth larval ecdysis. ...AM, topical application ($5 \mu\text{g}$) of JHA; ---AC, no topical application of JHA (control); SP₁, storage protein 1. In the figure, the hemolymph proteins of 2 days-old larvae after the initiation of spinning were analyzed and the silkworm was fed on artificial diet during the period of larval stage.

4. 合成幼若ホルモン (methoprene) 處理が 누에의 體液中的 貯藏蛋白質(SP₁)의 量에 미치는 影響

JHA(Juvenile Hormone Analogue)인 methoprene이 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶의 體液蛋白質 中, 貯藏蛋白質量(SP₁)에 미치는 影響을 電氣泳動像으로 分析하였다(그림 9, 10, 11, 12).

5령 4, 6일째까지는 桑葉育蠶 또는 人工飼料育蠶 多 같이 處理區別 methoprene(0, 5, 10 μg)이 貯藏蛋白質, SP₁의 量에 미치는 效果는 뚜렷한 差異를 보이지 않으나(그림 9, 10), 5령 8일(그림 11) 및 吐絲 2일(그림 12)째의 methoprene 5 μg 處理區에서는 SP₁蛋白質 밴드가 對照區 또는 10 μg 處理區 보다 濃도가 짙었고, 對照區와 10 μg 處理區의 SP₁의 濃度는 서로 비슷하였다. 한편, SP₁ 및 다른 體液蛋白質의 精確한 相對濃度의 差異를 알기 위하여 densitogram을 작성한다,

그림 13(桑葉育蠶의 吐絲 2일째의 methoprene 處理區)의 methoprene 無處理區(-MC)와 5 μg 處理區(...MM)의 貯藏蛋白質 SP₁은 그 相對濃度에 있어 뚜렷한 差異

IV. 考 察

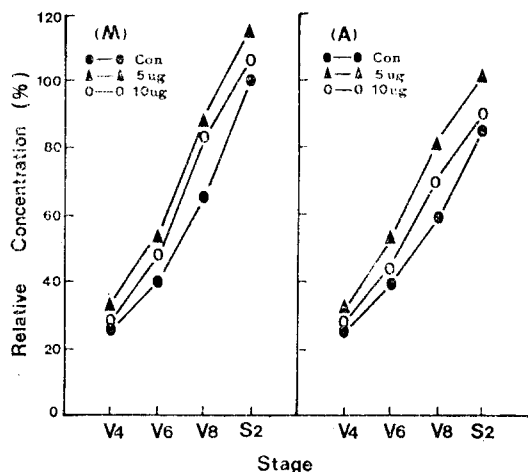


Fig. 15. Changes of SP₁ (storage protein 1) in the hemolymph of the silkworm reared with mulberry leaves and artificial diet after topical application—control (●—●), 5μg (▲—▲), 10μg (○—○)—with Juvenile Hormone Analogue (JHA), methoprene, on the 60th hour of the fifth instar silkworm. M, hemolymph proteins of the silkworm reared with mulberry leaves; A, hemolymph proteins of the silkworm fed on artificial diet; V4, four days after the fourth larval ecdysis; V6, six days after the fourth larval ecdysis; V8, eight days after the fourth larval ecdysis; SP₂, 2 days after the initiation of spinning. Relative concentration was determined by densitometric analysis using female larval hemolymph of stage S₂ in larvae reared with mulberry leaves as standard.

가 보였다. 또한 그림 14(人工飼料育蠶의 吐絲 2일째의 methoprene處理區)의 methoprene 無處理區(—AC)와 5μg處理區(…AM)의 貯藏蛋白質 SP₁은 桑葉育蠶에 있어서와 같이 뚜렷치는 않으나, 약간의 差異는 認定되었다. 그리하여, 이러한 差異를 정확히 알기 위하여, 飼料, 發育段階, methoprene 處理區別, SP₁의 量을 全體 體液蛋白質에 대한 상대적인 量으로 환산하여 보면(그림 15), methoprene의 각 處理區가 SP₁의 量에 미치는 影響은 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶 다같이 5μg > 10μg > 對照區 순이었고, 發育時期別 SP₁ 量은 methoprene의 處理 및 飼料의 種類에 관계없이 다같이 S₂ > V₈ > V₆ > V₄ 순이었다. 특히, 5령 6일째부터 그 相對濃度가 급증했다. 飼料別 methoprene의 效果는 대체로 桑葉育蠶이 人工飼料育蠶보다 그 效果가 약간 높음을 알 수 있으나, 매우 근소한 差異를 보였다.

1. 桑葉育蠶과 人工飼料育蠶의 體液蛋白質에 있어서 貯藏蛋白質(SP₁, SP₂) 및 Vitellogenin의 消長

昆蟲에 있어서, cecropia 蠶(*Hyalophora cecropia*)으로 부터 雌特異蛋白質이 發見된 以來(Telfer, 1953), 많은 昆蟲에 있어서, 體液中에 雄에는 微量이지만, 雌에는 多量으로 檢出되는 雌特異蛋白質의 존재가 밝혀졌고, 이에 대한 많은 研究가 이루어져 왔다. 누에의 경우, 雌特異蛋白質은 2가지가 존재하는데 그 하나는 貯藏蛋白質 SP₁이고, 다른 하나는 vitellogenin이라고 하였다.

本 實驗에서 SP₁은 人工飼料 및 桑葉育蠶에서 5령 누에(Tojo *et al.*, 1980; Pan *et al.*, 1969)의 初期까지는 性特異성이 없으나, 5령 中期(5령 4~6일)부터 化蛹前期까지는 雌特異성을 확실히 보였다(그림 1, 2), 그러나, SP₂는 雌雄間에 性特異성이 認定되지 않았다. 5령 幼蟲期~化蛹期까지는 SP₁이 雌特異성을 나타낸 반면, 化蛹期이후는 vitellogenin이 SP₁의 消滅과 동시에 새로 出現하여, 雌特異성을 보였다(그림 3, 4). 이것은 SP₁과 vitellogenin이 밀접한 관계를 가지고 있음을 시사하고 있다. 그림 3, 4에서 蛹期에 vitellogenin(VG)이 새로 나타나는 대신 SP₁ 및 SP₂는 암·수번테기體液에서 완전히 消滅했다. 그러면 소멸된 2가지의 貯藏蛋白質 중, 어느 것이 과연 vitellogenin과 관련이 있는가? 만일 SP₂가 관련이 있다면, 수번테기에서도 SP₂가 脂肪體로 들어가(Mine *et al.*, 1983) 없어진 대신, VG가 나타나야 할 것이다. 그러나, 수번테기에서는 전혀 VG가 나타나지 않으므로, 일단, SP₂는 VG와 관련이 없는 貯藏蛋白質로 생각되어진다. 그러나 SP₁이 없어진 雌蛹에서는 반드시 VG를 가지고 있으므로, SP₁은 VG 合成을 위한 일종의 貯藏蛋白質로 VG와 밀접한 관계가 있다고 생각한다. 한편, 雌蛹의 脂肪體로 재 흡수되었기 때문에 體液에서 消滅된 것으로 보고된 SP₂(Mine *et al.*, 1983)는 과연 무슨 역할을 하는가? 이에 대하여는 研究가 없어, 앞으로 더 많은 研究가 수행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 vitellogenin이 雌에서만 合成되는 이유는 무엇일까? 이것은 5령 幼蟲期の 雌幼蟲脂肪體에서 RNA를 추출하여 무세포계에서 翻譯하면, SP₁, SP₂의 2가지 貯藏蛋白質이 동시에 생성되지만, 雄의 脂肪體 RNA에는 SP₁-mRNA의 活性이 거의 보이지 않는 것(Izumi *et al.*, 1980a)으로 보아, SP₁의 性特異性 發現은 雌蠶의 mRNA 段階에서

이미 결정되는 것으로 생각되어진다.

2. Vitellin subunit의 分子量推定

桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶에 있어서, vitellin의 subunit 分子量이 體液 vitellogenin의 subunit의 分子量과 같은 지의 여부를 體液 vitellogenin의 subunit를 標準으로 하여 실험한 結果, 거의 差異가 없었다. vitellin-heavy chain(VTL-H)의 分子量과 vitellin-light chain(VTL-L)의 分子량을 Isumi & Tomino(1980)는 180,000, 42,000으로, 井口・中井(1978)은 142,000, 46,500으로 推定하였다. 本 實驗에서 推定된 分子量(VTL-H; 186,000, VTL-L; 41,000)은 Isumi & Tomino(1980)의 것과 대체로 비슷한 경향이다.

한편, Chino 등(1977)은 eri蠶 vitellogenin의 天然 分子量은 500,000이고 그 subunit인 VTL-H는 230,000, VTL-L은 55,000으로 推定하여, 本 實驗에서 推定된 分子量과는 상당히 差異가 있으나, 이것은 昆蟲의 種類에 의한 差異라고 생각된다. 結果적으로, 누에 vitellin은 그 飼料가 桑葉이든 人工飼料이든지 간에 vitellin의 分子量에서는 거의 差異가 없음을 알 수 있다.

3. Methoprene (Juvenile Hormone Analogue; JHA) 處理가 누에의 體液中的 貯藏蛋白質量에 미치는 影響

幼若호르몬(Juvenile Hormone; JH)는 最初 Williams(1956)에 의하여 cecropia蠶의 雄成蟲에서 抽出이 시행된 이래, Röler(1967)가 cecropia蠶에서 抽出하는데 처음으로 성공하였다. 그 후, 4가지 種類(JH₀, JH₁, JH₂, JH₃)의 JH가 昆蟲으로부터 同定되어 졌으며 (Meyer *et al.*, 1968; Judy *et al.*, 1973; 山下, 1978), 合成幼若호르몬의 出現으로 누에 등 昆蟲의 成長發育에 미치는 效果에 대해, 1971년 이후, 다수의 연구자에 의해 研究되어 왔다(重松, 1978; 倉田等, 1978; 諸星, 1976).

또한, 幼若 hormone의 昆蟲體에 대한 作用은 매우 복잡하며 發育時期에 따라서도 다른 作用을 한다고 알려져 있다. 일반적으로 그 作用은 皮膚의 眞皮細胞에 현저히 나타나며, 中樞神經系, 生殖腺, 中腸과 같은 内部器官의 成熟 및 變態에 影響을 준다. 또한, JH는 生殖器官의 成熟에도 影響을 주는 것으로 알려져 있다. 즉, 雌에서는 脂肪體의 雌特異蛋白質의 合成을 促進하고, 雄에서는 生殖器官의 付屬腺의 活性에 관여하고 있는 등, 그 作用機作이 매우 복잡하고 광범위하다 (Barth, 1961; Borden *et al.*, 1969; 石井, 1972).

누에의 경우, JHA 處理는 5령 期間을 延長하고 또 繭重을 10% 前後 增加시키고 특히, 繭層重이 1.2g에 가까운 初重繭도 얻게 하였으며(赤井, 1982), 蛋白質의 合成에 지대한 影響을 미친다(倉田・Dailie, 1978)

그림 15에서 methoprene의 5 μ g, 10 μ g 處理區는 桑葉育蠶 이나 人工飼料育蠶 모두, 對照區보다 全體體液蛋白質에 대한 SP₁의 相對濃度가 높았다. 이는 JHA에 의하여, 脂肪體의 蛋白質合成이 촉진되었음을 말해준다. 이러한 結果는, SP₁이 vitellogenin과 관계가 있으므로 JHA가 卵黃蛋白質의 合成을 촉진하게 된 것을 간접적으로 시사해주고 있는 것이다.

V. 摘 要

家蠶의 卵黃主要蛋白質인 vitellogenin에 관한 研究의 일환으로 桑葉育蠶과 人工飼料育蠶의 發育時期에 따른 貯藏蛋白質 SP₁, SP₂ 및 vitellogenin의 變動像, JHA가 이들 蛋白質에 미치는 影響과 vitellogenin의 最終產物인 vitellin의 subunit의 分子量 推定을 행한 바, 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 貯藏蛋白質 SP₁은 雌特異성이 있으며, 그 特性의 出現時期는 桑葉育蠶은 5령 6일, 人工飼料育蠶은 5령 4일이었으며, 吐絲 2일까지 그 特性이 유지되었다.

2. 貯藏蛋白質 SP₂는 性特異성이 전혀없는 蛋白質이었고, 體液中的 消滅時期는 桑葉育蠶이 化蛹 1일, 人工飼料育蠶이 化蛹 2일이었다.

3. 化蛹 1일째부터 雌特異성이 있는 vitellogenin이 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶에서 다같이 出現하였으며, 發育이 진전됨에 따라 그 合成量이 漸增하였다.

4. 卵 vitellin의 subunit(vitellin-heavy chain; VTL-H, vitellin-light chain; VTL-L)의 分子量은 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶 다같이 差異가 없었으며, vitellin의 H鎖(VTL-H)가 186,000, vitellin의 L鎖(VTL-L)가 41,000이었다.

5. 桑葉育蠶 및 人工飼料育蠶에서 JHA는 5齡누에의 體液中的 SP₁ 蛋白質量을 크게 增加시켰으며, 특히 5 μ g處理區가 가장 많이 增加되었다.

引 用 文 獻

- 鮎澤啓夫・小林勝利・阿部文子(1960) 日蠶雜 29, 197-202.
Ajami, A.M., and Riddiford, L.M (1973) *Insect physiol.* 19, 635-645.
赤井 弘(1982) 蠶絲科學と技術. 21(1), 44-47.
Auclair, J.L.(1959) *J. Insect physiol.* 3, 127-131.
Bell, W.J., (1969) *J. Insect physiol.* 15, 1279.
Bergink, E.W., and Wallace, R.A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2879-2903.

- Brookes, V.J. (1969) *Dev. Bio.* 20, 459-471.
- Chen, T.T., Starhendorf, P.W., and Wyatt, G.R. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5325-5331.
- Chino, H., Murakami, S., and Harashina, K. (1969) *Biochem. Biophys. Acta.* 176, 1-26.
- Chino, H., Yamagata, M., and Takahashi, K. (1976) *Biochem. Biophys. Acta.* 441, 349-353.
- Coles, G.C. (1965) *J. Insect physiol.* 11, 1325.
- Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Academic science.* 121, 404.
- De loof, A., and De wilde, J. (1970) *J. Insect physiol.* 16, 157.
- Deeley, R.G., Mullinix, K.D., Welekam, W. Kroneberg, H.M., Meyers, M., Eldridge, J.D., and Goldberger, R.F. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9060-9066.
- Dejmal, R.K., and Brookes, V.J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 869-874.
- Doira, H., and Kawaguchi, Y. (1972) *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 17, 117-125.
- Durzun, D.T., and S.M. Lopushanski. (1968) *J. Insect physiol.* 14, 1485-1497.
- Engelmann, F. (1969) *Science.* 165, 407-409.
- Engelmann, F. (1971) *Archs. Biochem. Biophys.* 145, 439-447.
- Engelmann, F. (1972) *Gen. Comp. Endocr.* 3, 168-173.
- Engelmann, F. (1974) *Am. Zool.* 14, 1195-1206.
- Engelmann, F., and Ladduwabetty, M. (1974) *Zool. Jb (physiol).* 78, 289-300.
- Engelmann, F. (1979) *Adv. Insect physiol.* 14, 49-108.
- Fallon, A.M., Hagedorn, H.H., Wyatt, G.R., and Laufer, H. (1974) *J. Insect physiol.* 20, 1815-1823.
- Georges Buhlmann. (1976) *J. Insect physiol* 22, 1101-1110.
- Greengard, O., Sentebac, A., and Aos, G. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1687-1691.
- 林屋慶三・内田由子・西田順(1986) 日本應用動物昆蟲學會誌.
- 稻神馨(1954) 日蠶雜 23, 304-307.
- 井口民夫・中井正憲(1978) 蠶試報 27, 579-593.
- Izumi, S., and Tomino, S., and Chino, H. (1980b) *Insect Biochem.* 10, 199-208.
- 泉進・富野士良(1976) 動雜 85, 406.
- 木村敬助・木四信・赤井弘(1980) 日蠶雜 55(44), 335-337.
- Koppe, J., and offengand, J. (1975) *Archs. Biochem. Biophys.* 173, 100-113.
- 倉田啓而・Daillie, J. (1978) 蠶試報 27, 507-530.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature.* 227, 680.
- 諸星(1976) 蠶の發育生理. pp. 239, 東大出版會, 東京.
- Mille, E., Izumi, S., Katsuki, M., and Tomino, S. (1983) *Dev. Biol.* 97, 329-337.
- Mullinix, K.P., Wetekan, W., Deeley, R.G., Gordon, J.J., Meyers, M., Kent, K.A., and Goldberger, R.F. (1976) *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1442-1446.
- Munn, E.A., and Greville, G.D. (1969) *J. Insect physiol.* 15, 1935-1950.
- Munn, E.A., Feinstein, A.A., and Greville, G.D. (1971) *Biochem. J.* 124, 367-374.
- Ono, S., Nagayama, H., and Shimura, K. (1975) *Insect Biochem,* 5, 313-329.
- Pan, M.L., Bell, W.J., and Telfer, W.H., (1969) *Science.* 165, 393-394.
- Pan, M.L., and Wyatt, G.R. (1971) *Science.* 174, 503-505.
- Pan, M.L., and Wyatt, G.R. (1976) *Dev. Biol.* 54, 127-134.
- Röler, H., Dahm, KH., BH Trost (1967) *J. Amer. Chem. Soc.* 89.5.
- Shigemotsu, H. (1958) *Nature,* 82, 880-882.
- 重松孟(1978) 日蠶雜 47(4), 292-300.
- Telfer, W.H., and Williams, C.M. (1953) *J. Gen. physiol.* 36, 389-413.
- Telfer, W.H. (1954) *J. Gen. physiol.* 37, 539-558.
- Tata, J.R. (1976) *Cell* 9, 1-14.
- Thomas, J.K. and Richard, P. (1976) *J. Insect physiol.* 22, 1381-1393.
- Tojo, S., Nagata, M., and Kobayash, M. (1980) *Insect Biochem.* 10, 289-303.
- Villeneau, J.L. (1962) *J. Insect physiol.* 5, 585-588.
- Wilkens, J.L. (1969) *J. Insect. physiol.* 15, 1015.
- Wigglesworth, V.B. (1970) *Insect hormone, oliver and Boyol.*
- Williams, C.H. and F.C., Kafatos (1956) *Insect hormone, Academic press* (1972)
- 山下(1978) 化學と生物 16, 616-625.