

누에 體液의 幼若호르몬 結合蛋白質(Juvenile hormone binding protein)에 관한 研究

孫 興 大
東亞大學校 農科大學

Study on the Juvenile Hormone Binding Protein in the Hemolymph of the Silkworm Larva, *Bombyx mori*.

Hung-Dae Sohn
College of Agriculture, Dong-A University

Summary

In order to examine a physiological role of juvenile(JH) binding proteins in the hemolymph of the silkworm larva, *Bombyx mori*, [^3H] JH I incubated hemolymph was separated by polyacrylamide gel electrophoresis in the fifth-instar larva and the activity of the binding protein was analyzed using charcoal binding assay.

The results obtained were as follows;

1. The JH was bound by two protein fractions in the hemolymph of the fifth-instar larva; One was JH binding lipoprotein(JH-LP), the other was JH specific binding protein(JHBP). Their relative mobility values(Rm) were 0.3~0.33 and 0.81~0.84, respectively. There were no valid differences in those values from developmental stages of both male and female silkworms.
2. Total protein contents of the hemolymph were gradually increased during the fifth-instar larva, while at the prepupa decreased. The maximum ones were observed at the spinning period and the contents from female were much higher than those from the male.
3. JH binding activity per ml of the hemolymph was low in the early stage of the fifth-instar larva and its activity was maximized at the spinning period and at the prepupa slightly decreased.
4. There was a similar pattern between changes of the JH binding activity per ml of the hemolymph and of the total protein contents of the hemolymph.
5. The JH binding activity per mg of the hemolymph proteins was high in the early stage of the fifth-instar larva, while from the 6th day of the fifth-instar larva to the prepupa its activity showed the lowest levels.

I. 緒 論

幼若호르몬(juvenile hormone; JH)은 昆蟲의 成長과 生殖을 調節하는 重要한 內分泌的 機能을 隨行하며, 이 호르몬의 濃度는 주로 알파타體에 의한 合成率과

幼若호르몬 結合蛋白質(juvenile hormone binding protein; JHBP) 및 幼若호르몬 特異에스테라제(juvenile hormone specific esterase; JHE)에 의해 調節되어 진다(de Kort & Granger; 1981).

JH와 結合하는 蛋白質에 關係서는 Whitmore와 Gilbert(1972)가 Saturniid 나방의 體液에서 JH와 結合

하는 脂質蛋白質을, Kramer 등 (1974)은 *Manduca sexta*의 體液에서 JH와 特異적으로 結合하는 蛋白質이 存在함을 各々 報告하였다. 이후 多數의 昆蟲種에서 이들 蛋白質이 檢出되었으며 또한 生化學的 特性도 밝혀지고 있다(Kramer et al.; 1976 a,b, Goodman et al.; 1978, Klages & Emmerich; 1979, Peterson et al.; 1982, Dillwith et al.; 1985).

JHBP는 脂肪體에서 合成되어 體液으로 放出되며 (Nowock et al.; 1975, Ferkovich et al.; 1977, Dillwith et al.; 1985), 이때 알라타體에서 分泌된 遊離 JH와 結合하여(Pratt & Tobe; 1974) 標的組織으로 JH를 輸送하며, 또한 에스테라제(esterase)에 의한 JH의 分解를 防止하는 것으로(Hammock et al.; 1975, Sanburg et al.; 1975) 알려져 있다.

JHBP는 體液을 비롯한 脂肪體, 筋肉, 網絲腺 및 cuticle 등 各々 組織이나 器官에 分布하고 있으며 (Wisniewski Kochman; 1984, & Goodman & Chang; 1985), 또 이 蛋白質은 各 齡 및 變態期에 特徵적인 變化를 나타냄에 따라 JHBP의 濃度を 制御하는 要因과 이 蛋白質의 JH의 輸送 및 保護 이외의 또 다른 役割을 밝히는데 研究의 關心이 集中되고 있다(Goodman & Gilbert; 1978, Ozyhar et al.; 1983, Lessman & Herman; 1984, Goodman; 1985).

한편 누에서 JH는 幼蟲期間의 延長에 따라 蠶體重, 繭重 및 繭層重 등을 增加시키므로 이에 관한 生理學的 研究과 더불어 增絲劑로서의 實用的 利用에 대한 研究도 활발히 進行되고 있다(赤井 등; 1973, 室賀 등 1975, 倉田, Daillie; 1978, Shigematsu; 1982, 馬 등; 1984, 赤井, 田村; 1985, 孫 1986). 그러나 누에에 있어서는 아직 JHBP의 存在가 確認된 바 없으며 특히 JHBP의 生理的 役割에 관한 研究는 거의 없는 實情이다.

따라서 本 研究는 5齡 누에의 體液內에 JHBP의 存在有無를 確認하고 또한 發育에 따른 JHBP活性的 變化를 分析 比較함으로써 JH 作用機作的 基礎資料를 얻고자 隨行하였다. 그리고 이 論文은 1986년도 文敎部 自由課題 學術研究組成費에 의하여 隨行되었다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗昆蟲

本 實驗에 使用된 누에品種은 七寶蠶이었고 飼育條件은 溫度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 甁일으로 飼育하였다.

2. 試料의 採取 및 調製

體液의 採取는 누에를 70% ethanol를 消毒한 후 第

11環節 背面에 있는 꼬리뿔을 가위로 잘라 冷却된 試驗官에서 適當量을 모았다.

收集된 體液은 0.01M Tris-HCl, pH 7.2 (DFP 10^{-3}M , paraoxon 10^{-4}M , PTU 10^{-4} 包含) buffer로 稀釋한 후 0°C 에서 27,000g로 10分間 遠心分離하여 上層液을 試料로 使用하였다.

3. JH stock solution의 調製

JH stock solution은 合成 JH 1(cis-10,11-epoxy-7-ethyl-3,11-dimethyl-trans, trans-2,6-tridecadienoic acid methyl ester; Sigma)과 [$10^{-3}\text{H}(\text{N})$] JH 1(specific activity 15.5Ci/m mole; NEN)을 各々 benzen; hexane (4:1)에 溶解하여 適當量을 5%(w/v)의 polyethylene glycol로 前處理된 유리용기(Giese et al.; 1977)에 옮겨 混合한 뒤 질소가스로 有機溶媒를 揮發시켰다. 이어 이 混合物을 ethanol로 溶解한 후 0.01M Tris-HCl (pH 7.2) buffer로서 目的濃度로 調製하였다(Kramer et al.; 1974).

4. 電氣泳動

電氣泳動은 Davis(1964)法에 의하여 7.5%(w/v) polyacrylamide slab gel과 Trisglycine(pH 8.3) beffer를 使用하였다. 試料는 稀釋된 體液 25 μl (蛋白質은 約 125ug)을 注入하였고 電流는 gel당 2mA로 4°C 에서 4時間 通電하였다.

蛋白質의 染色은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 水溶液으로 하였고 脫色은 isopropanol-acetic acid-distilled water(125:100:75) 混合液으로 하였다. 脂質蛋白質의 染色은 Mauer(1971)法에 따라 acetone-acetic acid-distilled water(20:15:65)에 녹인 0.5% Sudan black B 溶液으로 24時間 하였으며 脫色은 acetone-acetic acid-distilled water(20:15:65) 溶液으로 하였다.

蛋白質의 染色強度는 densitometer DMV-53C(Toyo, Japan)로 620nm에서 吸光度를 測定하였다.

한편 JH와 結合된 蛋白質의 檢出은 蛋白質이 分離된 gel을 染色하지 않은 乾 gel slicer로 3mm씩 잘랐다. 各 切片들을 試驗官에 넣고 50°C 에서 2時間동안 乾燥시킨 뒤 0.25ml의 30% H_2O_2 를 가하고 50°C 에서 하룻동안 活性化시킨 뒤 10ml의 scintillation fluid(tolune; 667ml, triton X-100; 333ml, PPO; 4g, POPOP; 0.08g)와 混合하여 liquid scintillation counter(Beckman; LS 6, 800, USA)에서 放射能을 計測하였다(Hames & Rickwood; 1983).

5. 幼若호르몬 結合蛋白質(JHBP)의 活性 測定

幼若호르몬 結合蛋白質(JHBP)의 活性은 Goodman 등 (1976)의 方法을 變形하여 測定하였다.

먼저 charcoal은 1N HCl, 증류수, 1% NaHCO₃ 등으로 中性이 될때까지 洗滌하였다.

charcoal-dextran 懸濁液의 調製는 charcoal을 0.5% dextran이 含有된 0.01M Tris-HCl (pH 7.2) buffer에 5%가 되도록 混合하고 이 混合物를 다시 0.005M Tris-HCl(pH 7.2) buffer로 10배 稀釋하였다.

JHBP의 活性 測定은 20 μ l의 JH stock solution(5 \times 10⁻⁶M)과 稀釋된 體液 100 μ l을 混合하여 서서히 진탕한 후 4°C에서 5~120分間 活性化시켰다. 이어서 100 μ l의 charcoal-dextran 懸濁液을 添加하여 빠르게 진탕시키고 다시 4°C에서 10分間 活性化시킨 뒤 8,000g에서 10分間 遠心分離를 행한 후 上層液 100 μ l를 取하여 10ml의 scintillation fluid와 混合하여 放射能을 計測하였다.

6. 體液蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowery등 (1951)의 方法을 變形하여 測定하였다.

試料에 alkaline copper溶液 3ml를 넣어 잘 混合하고 10分間 放置한 후 phenol reagent 0.3ml를 넣어 30分間

放置하였다가 spectrophotometer(Cecil 2924, England)로 500nm에서 吸光度를 測定하였다. 標準蛋白質은 0.04% bovine serum albumin을 使用하였다.

III. 實驗結果

1. JH 1 結合體液 蛋白質의 電氣泳動

누에 體液에서 JH 1과 結合하는 蛋白質을 檢出하기 위하여 [³H] JH 1(3 \times 10⁻⁸M)로 標識한 體液을 7.5% polyacrylamide gel로 電氣泳動한 結果는 그림 1과 같다.

分離된 蛋白質에서 Coomassie brilliant blue에 染色된 band는 約 20個였으며 이 중 Sudan black B에 兩性反應을 나타내는 脂質蛋白質은 5齡 1日에서 4個, 吐絲開始에서는 5~6個가 나타났다.

體液蛋白質중 [³H] JH 1과 結合하는 蛋白質을 調査한 바 相對移動度(R_m)가 0.3~0.33과 0.81~0.84인 蛋白質이 [³H] JH 1과 結合하여 높은 放射能을 나타내

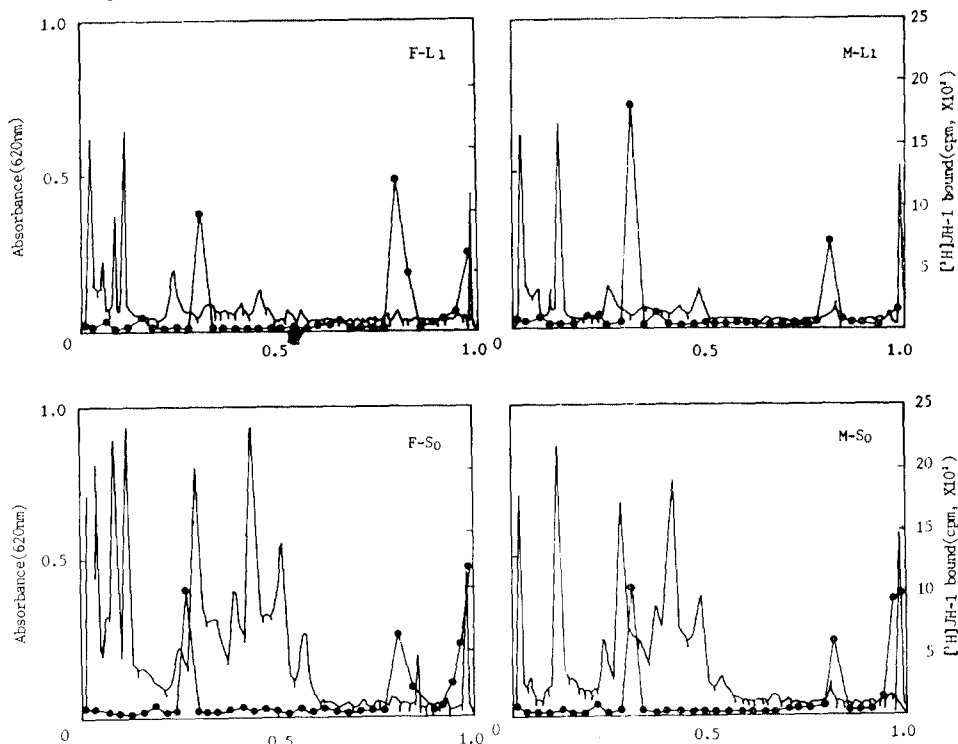


Fig. 1. 7.5% polyacrylamide gel, densitometer scan, and radioactivity elution profile from electrophoresis of hemolymph in *Bombyx mori*.

*JH-LP: JH binding lipoprotein, JHBP: JH specific bindingprotein.

F-L₁: 1st day of the fifth-instar larva (female).

M-L₁: 1st day of the fifth-instar larva (Male).

F-S₀: Start of the spinning (Female).

M-S₀: Start of the spinning (Male).

었다. 2種의 JH 1 結合蛋白質 중 Rm이 0.3~0.33인 蛋白質은 Sudan black B에 陽性反應을 나타내는 脂質蛋白質이었으며 Rm이 0.81~0.84인 蛋白質은 JH 1과 特異的으로 結合하는 蛋白質이었다. 따라서 5齡 누에의 體液에는 JH 結合脂質蛋白質(juvenile hormone binding lipoprotein; JH-LP)과 JH 結合蛋白質(juvenile hormone binding protein; JHBP)이 각각 1個씩 存在하였다.

또한 JH와 結合하는 蛋白質들의 Rm은 암수 또는 發育時期에 關係없이 一定하였다.

2. 암·수別 發育에 따른 體液蛋白質의 含量 變化
5齡期 동안 암수별 體液蛋白質 含量의 變化는 그림 2와 같다.

體液蛋白質含量의 變化樣相은 암수 모두 5齡 4일부터 增加하기 始作하여 吐絲期(吐絲開始期 및 吐絲 2日)에 最大로 되며 前蛹期에 약간 減少하였다.

암컷의 경우 5齡起蠶에서 8.5mg/ml로 가장 낮았고 吐絲開始에 89.7mg/ml로 가장 높았으며 수컷은 5齡 1에서 9.2mg/ml로 가장 낮았는데 反해 吐絲 2日에 60.0mg/ml로 가장 높게 나타났다.

암수간의 體液蛋白質 含量은 암컷이 顯著하게 높았다.

3. 體液의 JH 1 結合에 關한 特性

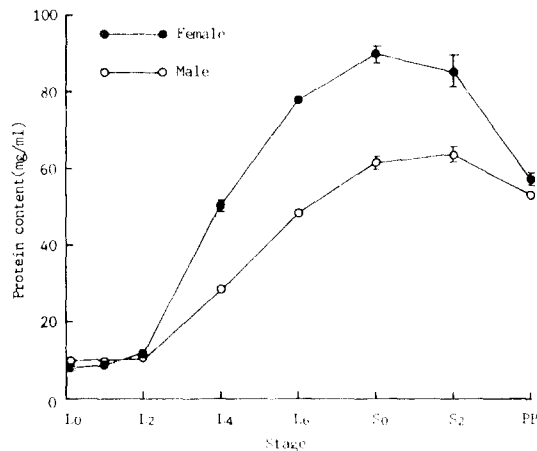


Fig. 2. Changes in protein content in the hemolymph during the fifth instar larva of *Bombyx mori*. Points represent the average of three determinations. Vertical bars indicate \pm SD.

*L₀: Start of the fifth-instar larva, L₁: 1st day of the fifth-instar larva, L₂: 2nd day of the fifth-instar larva, L₄: 4th day of the fifth-instar larva, L₆: 6th day of the fifth-instar larva, S₀: Start of the spinning, S₂: 2nd day of the spinning, PP: prepupa.

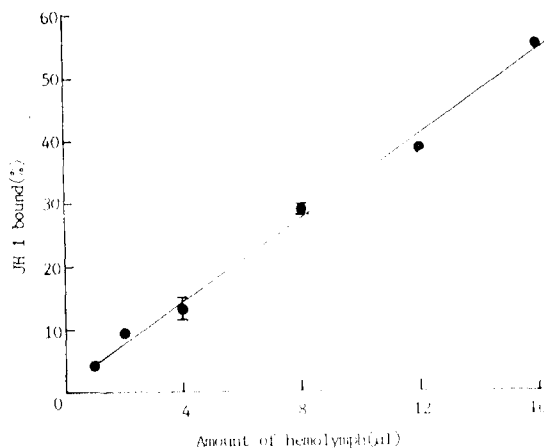


Fig. 3. Effect of hemolymph amount on binding of JH1 to the binding protein. Hemolymph was collected at the 4th day of the fifth-instar female larva of *Bombyx mori*. See Fig. 2 for details.

體液과 JH 1과의 結合活性 條件을 알기 위해 5齡 4日 암수에 體液을 使用하여 體液量과 反應時間에 따른 JH 1 結合活性의 關係를 調査하였다.

體液量에 따른 JH 1 結合活性은 體液量이 많아질수록 따라 JH 1 結合活性이 높게 나타났으며 이들의 相關關係는 거의 直線的이었다(그림 3). 本 實驗에서 體液量이 12μl일 때 JH 1의 結合活性은 38.4%로 나타났는데, 이 結合活性은 JHBP의 活性 測定에 最適條件인 35~40%의 JH 1 結合活性(Goodman et al.; 1976)의 範圍內에 있었다.

反應時間과 JH 1 結合活性의 關係는 그림 4와 같다.

反應時間에 따른 JH 1 結合活性은 最初 5分에서 38.5%로 가장 높았으며 10分~120分까지의 JH 1 結合

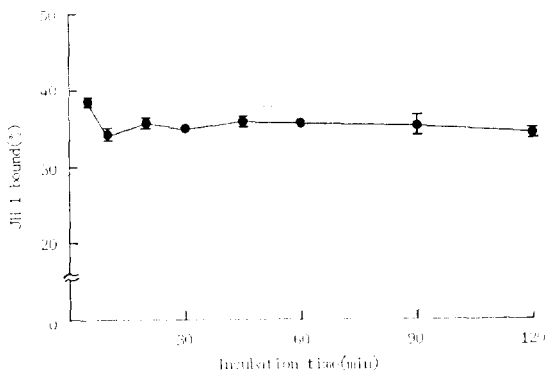


Fig. 4. Effect of incubation time on binding of JH 1 to the binding protein. See Fig. 3 for details.

活性은 34.4~36.0%로 거의 一定한 水準을 나타내었다.

따라서 本 實驗에서의 反應時間은 30分으로 하였다.

4. 發育에 따른 JHBP의 變化

5齡期 동안 JHBP의 活性을 測定한 結果는 그림 5, 6과 같다. 體液 ml當 JHBP活性은 암컷이 1.38~3.72n mole이었으며 吐絲開始에 가장 높았고 숫컷은 1.41~3.13n mole 사이로 吐絲 2日에서 가장 높게 나타났다.

JHBP 活性의 變化는 암수 모두 齡의 初期에는 낮았고 5齡 4日부터 顯著하게 增加하여 吐絲期(吐絲開始 및 吐絲 2日)에 最大로 되었다가 前蛹期에 減少하였다. 이와 같은 JHBP 活性의 變化樣相은 體液蛋白質의 變化와 類似하였으며 특히 最大濃度의 出現時期는 암수 각각 一致하였다(그림 2, 5, 6). 암수간의 JHBP 活性은 암컷이 숫컷보다 약간 높게 나타났다.

體液蛋白質 mg當 JHBP 活性은 암컷이 0.036~0.162n mole 사이로 5齡起蠶에서 가장 높았고 숫컷은 0.041~0.183n mole 範圍로 5齡 1日에서 가장 높게 나타났다. 이들의 變化樣相은 암수 모두 齡의 初期(0~2日)에 높은 活性을 나타내다가 점차 低下하여 5齡 6日

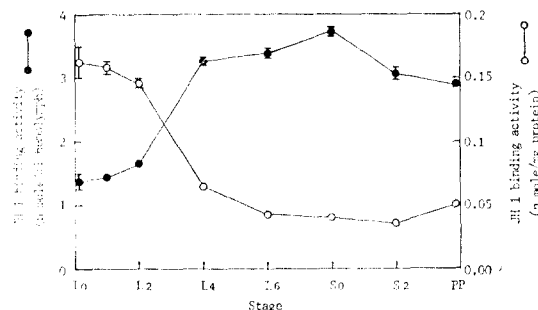


Fig. 5. Changes of JH 1 binding activity in hemolymph during the fifth-instar female larva of *Bombyx mori*. See Fig. 2 for details.

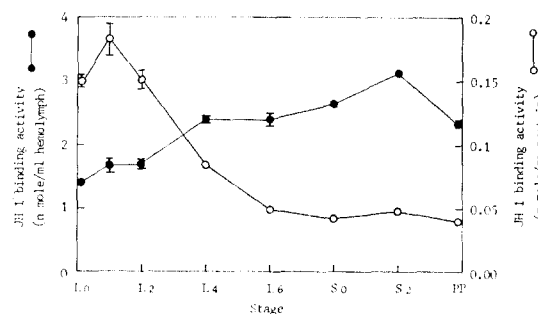


Fig. 6. Changes of JH 1 binding activity in hemolymph of during the fifth-instar male larva of *Bombyx mori*. See Fig. 2 for details.

에서 前蛹까지 매우 낮은 活性을 維持하였다.

IV. 考 察

JH 結合蛋白質은 JH의 濃度調節에 關與하므로 昆蟲의 發生期에 매우 重要한 구실을 한다.

本 實驗에서 누에는 體液에는 JH 1과 結合하는 2種의 蛋白質 즉 JH 結合脂質蛋白質(juvenile hormone binding lipoprotein; JH-LP)과 JH 結合蛋白質(juvenile hormone binding protein; JHBP)이 存在함을 確認하였다.

JH-LP는 나비목을 비롯한 메뚜기목, 노린재목, 딱정벌레목, 파리목등에서 檢出되었으며, 이 蛋白質의 數는 昆蟲種에 따라 多樣한 것으로 알려져 있다(Whitmore & Gilbert; 1972, Emmerich & Hartmann; 1973, Bassi et al.; 1977, Kramer & de Kort; 1978, Klages & Emmerich; 1979).

Turunen과 Chippendale(1981)은 電氣泳動法에 의해 *Diatraea crambidoides* 幼蟲의 體液에서 Rm이 0.32인 JH-LP를 檢出하고 이 蛋白質의 分子量은 高分子라고 報告하였는데, 本 實驗에서도 Rm이 0.30~0.33인 蛋白質이 JH-LP이었다.

一般的으로 JH-LP는 JH에 대해 親和性和 特異성이 낮으며 結合能은 높고 分子量은 약 10^6 달톤으로 JH를 輸送하는 機能을 가지고 있다(de Kort & Granger; 1981). 그러나 이 蛋白質은 JH가 過剩으로 있거나 JHBP가 飽和狀態로 되었을 때만 JH와 選擇의으로 結合한다고 한다(Kramer et al.; 1974, Ferkovich et al.; 1975).

JHBP는 주로 나비목에서 많은 研究가 이루어졌는데, 그 生化學的 特性은 JH에 대해 親和力이 높고 特異성이 顯著하며 分子量은 약 25,000~30,000달톤으로 單一 펩티드鎖로 되어 있다(Kramer et al.; 1976 b, Kramer & Childs; 1977, Goodman et al.; 1978, Rudnicka et al.; 1979, Peterson et al.; 1982).

Kramer 등(1976 b)은 *Manduca sexta*의 體液 JHBP를 分離 精製하여 7.5% PAGES로 分析한 結果 이 蛋白質의 Rm은 0.6이라고 하였으며, Dillwith 등(1985)은 7% PAGE에 의해 *Diatraea grandiosella* 幼蟲의 體液 JHBP를 分離한 結果 Rm이 0.71이라고 報告하였다. 本 實驗에서 JHBP의 Rm은 0.81~0.84로 위 報告들 보다는 多少 빠른 移動度를 나타내었는데 이것은 昆蟲의 種에 따라 JHBP의 電氣泳動的 性質이 다르다는 것을 意味하는 것으로 생각된다. 그러나 同一한 種에서는 性別, 發育時期에 따라 變化하지는 않는다.

本 實驗에서 體液蛋白質의 含量은 發育이 進行됨에

따라 顯著하게 增加하였으며, 吐絲期에 最大로 되었다가 前蛹期에 多少 減少하여 sigmoidal한 變化를 나타내었는데, 이 結果는 藤井·河口(1983)의 報告와 一致하였다. 이와 같은 體液蛋白質의 增加는 누에 體液중의 主要蛋白質成分인 貯藏蛋白質(Tojo et al.; 1980), 低分子脂質蛋白質(Gamo; 1978, Izumi et al.; 1981), vitellogenin(Ono et al.; 1975) 등의 增加에와 一致하는 것으로 보아 이들 蛋白質增加에 基因되는 것으로 생각된다.

Goodman(1985)은 JHBP와 JH의 關係를 考察하고 齡의 初期에 JH 濃도가 높으면 JHBP 濃도는 낮고, 齡의 中期以後 JHBP 濃도가 增加하기 始作하면 JH 濃도는 減少한다고 하여 JHBP와 JH는 서로 反對의 關係를 나타내는데 이러한 關係는 JHBP가 JH의 濃度維持에 重要한 役割을 하는 것을 意味한다고 했다.

本 實驗에서 體液 ml當 JHBP의 濃도는 5齡 4일부터 顯著하게 增加하여 吐絲期에 最大로 되며 前蛹期에 多少 減少하여, *Galleria mellonella*(Ozyhar et al.; 1983), *Manduca sexta*(Goodman & Gilbert; 1978, Goodman; 1985), *Trichoplusia ni*(Wing et al.; 1981) 등에 있어서 傾向과 類似하였다. 이와 같이 齡의 中期以後부터 JHBP의 活性이 높게 維持되는 現狀은 JHBP가 各種 標的組織속에서 있는 JH를 體液으로 移動시키므로서 JH 特異에스테라제(juvenile hormone specific esterase; JHE)에 의해 不必要한 JH의 除去를 助長하여(Wing et al.; 1984) 正常的인 變態가 誘導되도록 하는 것으로 생각된다.

한편 JHBP活性의 變化樣相은 體液蛋白質濃度の 變化와 類似한 關係를 나타낸다고 하였는데(Sparks et al.; 1979, Wing et al.; 1981, Ozyhar et al.; 1983, Goodman; 1985) 本 實驗에서도 위 報告와 一致하는 結果를 얻었다(그림 2, 5, 6). 이러한 結果는 JHBP 活性은 JH에 대한 親和力보다는 量的變動에 依存되어지기(Goodman and Gilbert; 1978) 때문인 것으로 생각된다. 또한 體液蛋白質 mg當 JHBP 活性은 齡의 初期에 높았다가 中期以後부터 낮은 水準을 維持하여 體液 ml當 JHBP 活性의 變化와는 反對의 結果를 나타내었는데, 이러한 사실은 JH는 體液蛋白質成分중 아무 蛋白質이나 結合하는것은 아니고 體液蛋白質중 特定蛋白質만 結合하는 特異성을 나타내며 이 蛋白質의 消長은 發育에 따라 減少하기(Ozyhar et al.; 1983) 때문인 것으로 생각된다. 또한 Rudnicka 등(1979)도 體液蛋白質에서 JH와 結合하는 蛋白質은 低分子蛋白質과 高分子蛋白質등이 있으며 이들중 低分子蛋白質의 結合活性이 매우 높다고 하여 이를 잘 立證하였다.

以上的 結果를 綜合하면 누에의 體液에는 JHBP가

存在하며, 이 蛋白質은 JH의 活性 調節에 重要한 役割을 하는 것으로 생각된다. 따라서 이 結果는 昆蟲의 JH 作用機作的 解明 및 養蠶에서 JH의 產業的 應用化에 대한 基礎資料로서 活用될 것으로 期待된다.

V. 摘 要

누에 幼蟲에 있어서 體液 JH 結合蛋白質(JHBP)의 生理的 役割을 알기 위하여, 體液중의 JH 1과 結合하는 蛋白質을 polyacrylamide gel 電氣泳動으로 分離하고, 또 發育에 따른 JH 結合蛋白質의 活性 變化를 測定한 結果는 다음과 같다.

1. 누에 體液중에서 JH 1과 結合하는 蛋白質은 JH 結合脂質蛋白質(JH-LP)과 JH 結合蛋白質(JHBP) 등 2種이었다. JH 脂質蛋白質의 Rm은 0.3~0.33이었고, JH 結合蛋白質의 Rm은 0.81~0.84이었다. 두 蛋白質의 Rm은 性別, 發育時期에 關係없이 一定하였다.

2. 體液蛋白質의 含量은 發育의 進行에 따라 점차 增加하여 吐絲期에 가장 높았으며 前蛹期에 多少 減少하였고 암컷의 含量은 수컷보다 높았다.

3. 體液 ml當 JH 結合蛋白質의 活性은 齡의 初期에 낮았고 吐絲期에 最大로 나타난후 前蛹期에 多少 減少하였다.

4. 體液 ml當 JH 結合蛋白質의 活性 變化는 體液蛋白質 含量의 變化樣相과 매우 類似하였다.

5. 體液蛋白質 mg當 JH 結合蛋白質의 活性은 齡의 初期에 높았고 5齡 6日에서 前蛹期까지 낮은 水準을 維持하였다.

參 考 文 獻

- 赤井 弘·木口憲爾·森謙治(1973) カイコ成長と變態に及ぼす幼若ホルモンの影響. 蠶試報 25(5):287-305.
- 赤井 弘·田村俊樹(1985) 幼若ホルモン活性物質の投與後の蠶體內分布と排泄. 應動昆 29(1):85-87.
- Bassi, S. D., Goodman, W., Altenhofen, C. and Gilbert, L.I. (1977) The binding of exogenous juvenile hormone by the haemolymph of *Oncopeltus fasciatus* Insect Biochem. 7:309-312.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121:404-427.
- De Kort, C.A.D. and Granger, N.A. (1981) Regulation of the juvenile hormone titer. A. Rev. Ent. 26:1-28.

- Dillwith, J.W., Mane, S.D. and Chippendale, G.M. (1985) High affinity juvenile hormone binding of the haemolymph of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Insect Biochem.* 15:233-246.
- Emmerich, H. and Hartmann, R. (1973) A carrier lipoprotein for juvenile hormone in the haemolymph of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 19:1163-1175.
- Ferkovich, S.M., Silhacek, D.L. and Rutter, R.R. (1975) Juvenile hormone binding protein in the haemolymph of the Indian meal moth. *Insect Biochem.* 5:141-150.
- Ferkovich, S.M., Oberlander, H. and Rutter, R.R. (1977) Release of a juvenile hormone binding protein by fat body of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *J. Insect Physiol.* 23:297-302.
- 藤井 博・河川 豊(1983) カイコの體液タンパク質發育經過にともなう變化, 特に主要タンパク質成分(MP5)の消長. *日蠶雜* 52(6):529-536.
- Gamo, T. (1977) Low molecular weight lipoproteins in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*; Inheritance, isolation and some properties. *Insect Biochem.* 8:457-470.
- Giese, C., Spinder, K.D. and Emmerich, H. (1977) The solubility of insect juvenile hormone in aqueous solutions and its absorption by glassware and plastics. *Z. Naturforsch.* 32c, 158-160.
- Goodman, W.G. (1985) Relative haemolymph juvenile hormone binding capacity during larval, pupal, and adult development in *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 15:557-564.
- Goodman, W.G. and Chang, E.S. (1985) Juvenile hormone cellular and haemolymph binding proteins. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Ed. by Kerkut G.A. and L.I. Gilbert), Vol. 7; pp.491-510. Pergamon Press, Oxford.
- Goodman, W. and Gilbert, L.I. (1978) The haemolymph titer of juvenile hormone binding protein and binding sites during fourth larval instar of *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocr.* 35: 27-34.
- Goodman, W., O'Hern, P.A., Zaugg, R.H. and Gilbert, L.I. (1978) Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from the haemolymph of the fourth instar tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Molec. Cell. Endocr.* 11:225-242.
- Goodman, W., Bollenbacher, W.E., Zvenko, H.L. and Gilbert, L.I. (1976) A competitive protein binding assay for juvenile hormone. In *The Juvenile Hormones*. (Ed. by Gilbert L.I.), pp.75-95. Plenum Press, New York.
- Hames, B.D. and Rickwood, D. (1983) Gel electrophoresis of proteins a practical approach. pp.56-58. ERL Press, England.
- Hammock, B.D., Nowock, J., Goodman, W., Stamoudis, V. and Gibert, L.I. (1975) The influence of haemolymph-binding protein on juvenile hormone stability and distribution *Manduca sexta* fat body and imaginal discs *in vitro*. *Molec. Cell. Endocr.* 3:167-184.
- Izumi, S., Fujie, J., Yamada, S. and Tomino, S. (1981) Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Acta.* 670:222-229.
- Klages, G. and Emmerich, H. (1979) Juvenile hormone binding protein in the haemolymph of third instar larvae of *Drosophila hydei*. *Insect Biochem.* 9:23-30.
- Kramer, K.J. and Childs, C.N. (1977) Interaction of juvenile hormone with carrier proteins and hydrolysis from insect haemolymph. *Insect Biochem.* 7: 397-403.
- Kramer, K.J., Dunn, P.E., Peterson, R.C. and Law, J.H. (1976) Interaction of juvenile hormone with binding proteins in insect haemolymph. In *The Juvenile Hormones* (Ed. by Gilbert L.I.), pp.327-341. Plenum Press, New York.
- Kramer, K.J., Dunn, P.E., Peterson, R.C., Seballos, H.L., Sanburg, L.L. and Law, J.H. (1976) Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* Johannsson (Lepidoptera: Sphingidae), *J. Biol. Chem.* 251:4979-4985.
- Kramer, S.J. and de Kort, C.A.D. (1978) Juvenile hormone carrier lipoproteins in the haemolymph of the Colorado potato beetle, *Leptinotarse decemlineata*. *Insect Biochem.* 8:87-92.
- Kramer, K.J., Sanburg, L.L., Kezdy, F.J. and Law, J.H. (1974) The juvenile hormone binding protein

- in the haemolymph of *Manduca sexta*, Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 71:493-497.
- 倉田啓而・Daillie, J. (1978) 合成幼若ホルモンの家蠶絹絲腺の發育および絹絲腺の核酸絹絲蛋白質合成におよぼす影響. 蠶試報 27(5):507-530.
- Lessman, C.A. and Herman, W.S. (1984) Juvenile hormone metabolism, binding and esterase activity in the haemolymph of the adult monarch butterfly (*Danaus P. plexippus* L.: Lepidoptera). Insect Biochem. 14:445-452.
- 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.
- Mauer, H.R. (1971) Disc Electrophoresis and Related techniques of Polyacrylamide Gel. In Electrophoresis (Ed. W. de Gruyter), pp.76, Berlin.
- 馬永一・權寧河・李相豊(1984) 幼若ホルモンに關する研究 II. 獎勵蠶品種に對する合成幼若ホルモン“마니나”の増産效果. 韓蠶誌 26(1):25-29.
- 室賀明義・中島正雄・青森侑二・小澤洋一・新村正純(1975) 合成幼若ホルモンの育蠶への利用に關する研究. 日蠶雜 44, 267~273.
- Nowock, J., Goodman, W., Bollenbacher, W.E. and Gilbert, L.I. (1975) Synthesis of juvenile hormone binding protein by the fat body *Manduca sexta*. Gen. Comp. Endocr. 27:230-239.
- Ono, S., Nagayama, H. and Shimura, K. (1975) The occurrence and synthesis of female and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 5:313-329.
- Ozyhar, A., Wisniewski, J.R., Sehnal, F. and Kochman, M. (1983) Age dependent changes in the binding and hydrolysis of juvenile hormone in the haemolymph of last instar larvae of *Galleria mellonella*. Insect Biochem. 13:435-441.
- Peterson, R.C., Dunn, P.E., Seballos, H.L., Barbeau, B.K., Keim, P.S., Riley, C.T., Heinrikson, R.L. and Law, J.H. (1982) Juvenile hormone carrier protein of *Manduca sexta* haemolymph. Improved purification procedure: Protein modification studies and sequence of the amino terminus of the protein. Insect Biochem. 12:643-650.
- Pratt, G.E. and Tobe, S.S. (1974) Juvenile hormone radiobiosynthesized by corpora allata of adult female locusta *in vitro*. Life Sci. 14:575-580.
- Rudnicka, M., Sehnal, F., Jaroim, P. and Kochman, M. (1979) Hydrolysis and binding of the haemolymph of *Galleria mellonella*. Insect Biochem. 9:569-576.
- Sanburg, L. L., Kramer, K.J., Kezdy, F.J., Law, J. H. and Oberlander, H. (1975) Role of juvenile hormone esterase and carrier protein in insect development. Nature, Lond. 253:266-267.
- 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. 51:27-34.
- 孫興大(1986) 幼若ホルモンが家蠶の體液蛋白質 및 아미노酸의變動에 미치는影響. 韓蠶誌 28(1):37-42.
- Sparks, T.C., Willis, W.S., Shorey, H. and Hammock, B.D. (1979) Haemolymph juvenile hormone esterase activity in synchronous last instar larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. J. Insect Physiol. 25:125-132.
- Tojo, S., Nagata, M. and Kobayashi, M. (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 10:289-303.
- Turunen, S. and Chippendale, G.M. (1981) Binding of juvenile hormone, methoprene and hydroprene to haemolymph proteins of larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Insect Biochem. 11:429-435.
- Whitmore, E. and Gilbert, L.I. (1972) Haemolymph lipoprotein transport of juvenile hormone. J. Insect Physiol. 18:1153-1168.
- Wing, K.D., Rudnicka, M., Jones, G. and Hammock, B.D. (1984) Juvenile hormone esterase of lepidopteran II. Isoelectric points and binding affinities of haemolymph juvenile hormone esterase and binding protein activities. J. Comp. Physiol. 15:213-223.
- Wing, K.D., Sparks, T.C., Lovell, V.M., Levinson, S.O. and Hammock, B.D. (1981) The compartmentalization and interrelationship of proteins involved in juvenile hormone metabolism in *Trichoplusia ni*. Insect Biochem. 11:473-485.
- Wisniewski, J.R. and Kochman, M. (1984) Juvenile-hormone-binding protein from silk gland of *Galleria mellonella*. FEBS. 171:127-130.