

누에 卵黃素 (Vitellin)의 分離와 免疫學的 特性 및 胚發育에 따른 含量變化

孫 基 旭·文 在 裕*

農村振興廳 蠶業試驗場·*서울대학교 農科大學

Purification and Immunological Properties of Vitellin, and its Quantitative Changes during Embryogenesis in the Silkworm, *Bombyx mori*

Kee Wook Sohn and Jae Yu Moon*

Sericultural Experiment Station, R.D.A. *College of Agriculture, Seoul National University.

Summary

Vitellin, the major yolk protein of the silkworm, *Bombyx mori* was purified, and its immunological properties and the quantitative changes during embryogenesis were studied. The ovary transplantation into male hosts was also carried out to find out its effect on the yolk protein synthesis.

The pupal vitellogenin and the egg vitellin of *Bombyx mori* were purified by DEAE-cellulose column chromatography. These two female specific proteins showed the same mobility in the polyacrylamide gel electrophoresis and the same reaction in the double immunodiffusion test. The immunological identity was also observed between the vitellins of *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*.

The rudimentary ovaries transplanted into the male hosts of silkworms produced eggs without vitellin, indicating that the yolk precursors synthesized in other female organ beyond the ovary were necessary to produce vitellins. The major yolk protein, vitellin was disintegrated and utilized mostly during late stage of embryogenesis. It was different characteristics from the egg specific protein, which was utilized continuously from the early embryonic stage.

緒 言

昆蟲의 卵巢內에 있어서 卵發育은 卵巢外 蛋白質 특히, 脂肪體에서 合成되어 血淸프로放出되는 vitellogenin의 濃수에 의해 일어난다(Engelman, 1979; Wyatt와 Pan, 1978). 卵黃主蛋白質인 卵黃素(vitellin)와 이의 前驅物質인 血淸프 vitellogenin은 여러 昆蟲에서 分離되어 그 特性이 밝혀지고 있다(Kunkel과 Nordin, 1985; Wojchowski와 Kunkel, 1987). Harnish와 White(1982)는 8 個目的 昆蟲 卵黃素에 대한 연구결과, 이 蛋白質은 large subunit 또는 small subunit 만으로

구성되어 있는 것과 이들 두 subunit을 구성요소로 하는 것 등의 세가지 種類가 있다고 하였다.

대부분의 昆蟲卵에 있어서 卵黃蛋白質의 組成은 全體의 약 80%이상을 차지하는 卵黃素(vitellin)가 主成分으로 비교적 單純하다(Engelmann, 1979; Hagedorn과 Kunkel, 1979). 그러나 몇가지 鱗翅目 昆蟲의 卵蛋白質은 더욱 복잡한 組成으로 되어 있는데 예를 들면, 産卵直後의 누에의 卵蛋白質은 卵黃素가 약 40%로 비교적 적고 30KDa蛋白質이 약 35%, 卵特異蛋白質(Egg Specific Protein, ESP)이 20~25%를 차지한다(Yamashita와 Irie, 1980; Irie와 Yamashita, 1980, 1983; Yamashita, 1986).

昆蟲의 脂肪體에서 合成되는 卵黃素와 달리 卵巢에서 生成되고 電氣泳動의 또는 疫免學的 特性이 다른 卵黃蛋白質이 분리되었고 이 蛋白質은 卵巢와 胚子發育에 있어서 利用 pattern이 特異하며 卵黃素와 상호 관련적인 役割을 한다고 알려졌다. 이 蛋白質의 명칭은 누에에 있어서는 卵特異蛋白質(Egg Specific Protein, ESP, Ono 등, 1975), cecropia蠶의 경우 para-vitellin (Engelmann, 1979), 그리고 모기의 경우에는 卵巢特異蛋白質(ovary-specific protein, Borovsky와 Van Handel, 1980) 이라고 불린다.

누에알의 胚發育단계별 卵黃素와 卵特異蛋白質(ESP)의 利用 pattern을 보면 卵黃素가 胚子發育 後期에 주로 分解·利用되는데 비해 ESP는 胚子發育 初期에 주로 利用되므로 ESP가 胚子發育에 더욱 重要하다고 하였다 (Irie와 Yamashita, 1980, 1983; Indrasith 등 1987). 또한 Yamashita와 Irie(1980)는 5齡期 누에의 卵巢를 수수에 移植하여 얻은 卵은 卵黃素가 결여 되어도 이를 高溫湯으로 處理하여 單位發生시키면 胚子が 正常的으로 成長하므로 卵黃素가 卵巢發育이나 胚發生에 必須인 단백질은 아니라고 하였다.

한편, 누에를 人工飼料로 사육한 경우에 vitellogenin의 分子量등 化學的 特性을 조사하였고(文等, 1986), 이어서 合成幼若호르몬(Juvenile hormone analogue, methoprene) 및 β -sitosterol과 α -tocopherol등의 營養物質 添加가 vitellogenin과 卵黃素의 含量에 미치는 영향에 대해 報告한 바 있다(文·孫, 1988).

本研究에서는 Chino 등(1969, 1977)이 Eri蠶의 vitellogenin 分離를 위해 確立한 方法에 따라 누에의 卵黃主蛋白質인 卵黃素와 이의 前驅物質인 蛹血림프中的 vitellogenin을 분리하고 이들 두 단백질간 및 누에의 先祖로 가장 近緣昆蟲인 桑蠶(*Bombyx mandarina*)의 卵蛋白質과의 免疫反應의 特性을 조사하였다. 이와 아울러 수수에의 精巢를 摘出한 후 卵巢를 移植하여 生成된 알에 卵黃素가 存在하는가와 胚發育過程中 卵黃素의 利用變化에 대해 調查하였다.

材料 및 方法

1. 누에 飼育과 試料採取

現在 1代交雜種으로 우리나라의 春秋兼用 獎勵品種인 白玉蠶(蠶 123×蠶 124)과 秋蠶期 장리품종인 大成蠶(蠶 125×蠶 126)을 標準飼育方法에 準하여 甁알으로 飼育하였다.

試料에 사용한 血림프는 5령 6일째의 幼蟲과 化蛹後

5일째의 번데기를 암수별로 구분하여 少量의 phenylthiourea가 들어있는 遠心管에 採取하여 사용때까지 -20°C 에 保存하였다.

家蠶(*Bombyx mori*), 桑蠶(*Bombyx mandarina*)과 天蠶(*Antheraea yamamai*)의 卵蛋白質은 化蛾直後의 암나방을 解剖하여 卵管을 採取한 후 電氣泳動用 試料은 5배의 인산완충액(pH7.0)을 넣고 또한 DEAE cellulose column chromatography用 試料은 10배의 0.125M KCl+0.02M 인산완충액(pH6.0)이 넣고 glass homogenizer로 磨碎한 후 12,000rpm으로 30分間 冷凍 遠心하여 脂肪層을 제거하고 上清液을 -20°C 에 使用 時까지 保存하였다.

또한 胚發育段階別 vitellin의 量的變化를 보기 위하여 알깨기 시작일과 그후 3, 5, 7, 8, 9일째의 알 및 點青卵, 催青卵을 위의 電氣泳動試料 調製方法에 따라 마쇄한 후 冷凍保存하였다.

한편 卵巢移植 實驗은 4眠후 絶食상태에서 12시간이 지난 누에를 암수별로 구분하여 各各의 生殖巢를 除去한 뒤 다른 암누에의 卵巢를 摘出하여 移植하고 여기서 成長 變態한 암수나방으로부터 卵管을 採取하여 위의 方法에 따라 蛋白質의 電氣泳動用 試料을 준비하였다.

2. 蛹血림프 Vitellogenin과 卵黃素(Vitelin)의 分離

번데기 血림프中的 vitellogenin과 누에알 卵黃素의 分離는 Chino 등(1969, 1977)의 方法에 準해서 遂行하였다. 즉, 5ml의 암번데기의 血림프 또는 前項에서 調製한 卵蛋白質 50ml를 75% 포화농도의 ammonium sulphate로 分離한 후 遠心分離한 沉전물을 7ml의 증류수에 희석하였다. 이를 1l 증류수를 每時間마다 갈아주면서 各各 4시간 및 2시간동안 透析管內에 혼탁물이 생길때까지 透析한 후 혼탁물을 遠心分離로 除去하였다.

여기서 얻은 試料中 蛹血림프 vitellogenin 分離用 試料에는 4배의 증류수를 넣어 0.2M 인산완충용액(pH6.5)으로, 卵黃素 分離用 試料에는 10배의 증류수를 넣고 0.2M 인산완충용액(pH6.0)으로 各용액의 농도가 2mM이 되도록 調整한 후 15,000rpm에서 30分間 冷凍心分離하였다. 이 沉전물을 各各 2ml씩의 上記 완충액으로 용해하여 100배의 증류수로 희석한 후 같은 方法으로 다시 원심분리하고 同沉전물을 3~4 ml의 0.04M 인산완충용액(pH6.0, vitellogenin 分離用) 또는 0.08M 인산완충용액(pH6.0, 卵黃素分離用)에 각각 희석하여 DEAE-cellulose column chromatography 試料로 사용하였다.

Ion交換 chromatography는 陰 ion 交換樹脂인 DE-AE-cellulose(Whatman社製, DE52)를 使用하였고 vitellogenin分離用은 0.04M인 산완충액 (pH6.0)으로 1.2×10cm의 column에, 그리고 卵黃素分離用은 0.08 M 인산완충액(pH6.0)으로 2.5×16cm column에 各各 充積시켰다. 위에서 준비한 試料를 넣은 후 같은 완충액으로 첫번째 elution을 하고 各各의 완충액에 0.25M KCl을 添加하여 두번째 elution을 하였다. 이때의 流速은 30ml/hr. 이었으며 280nm에서 O.D.를 측정하여 蛹血림프 vitellogenin 또는 卵黃素를 分割 수집하였다 이를 증류수에 대해 透析한 후 冷凍乾燥로 농축하였으며 polyacrylamide gel 電氣泳動으로 그 純粹도를 확인하였다.

3. 可溶性蛋白質의 Polyacrylamide Gel 電氣泳動
可溶性 卵蛋白質과 2項에서 分離한 蛹血림프 vitellogenin 및 卵黃素의 電氣泳動은 2mm 두께의 6.7% polyacrylamide slab gel을 使用하였다. 電氣泳動用試料는 5倍의 인산완충용액 (pH7.0)에 희석된 卵蛋白質 또는 DEAE-cellulose column chromatography에 의해 分離된 vitellogenin과 卵黃素 0.5ml씩을 少量의 bromophenolblue 가 들어있는 40% sucrose 1ml에 혼합하여 試料溝當 40 μ l씩 分注하였다.

電氣泳動은 Tris-glycine 완충액 (Tris 5mM, glycine 38mM, pH8.3)을 使用하여 30mA의 定電流를 3시간 정도 通電하였다. 泳動이 끝난 뒤 gel의 染色은 7% 醋酸溶液에 용해한 0.05% Coomassie blue R-250액으로 15시간 정도 한 후 7% 醋酸溶液으로 脫色하고 사진촬영하였다.

4. 蛹血림프 및 卵蛋白質의 抗血清 製造와 免疫擴散反應

化蛹後 5일째의 암번데기 血液 또는 產卵直後의 卵에서 分離된 可溶性蛋白質 1ml를 같은 量의 Freund's complete adjuvant와 three-way cock를 利用하여 完全히 混合하여 수토끼 (New Zealand White)에 1주일 간격으로 5회에 걸쳐 注射하였다. 最終 주사후 10일째에 토끼의 靜脈血을 채취하여 抗血清을 分離하고 56°C에서 30分間 處理後 0.1% NaN₃를 첨가하여 -20°C에 使用時까지 保存하였다.

두가지 이상의 抗原에 대한 同質性 여부를 알아보기 위한 2重免疫擴散反應은 Cuchterlony(1949)의 方法에 따라 인산완충용액 (pH7.0)을 使用한 1.5% agarose gel에서 실시하였다. 抗原抗體反應은 agarose gel上的 試料溝當 抗血清과 해당 試料를 20 μ l씩 넣어 20°C에 3日 保間濕상대로 둔 후 인산완충용액으로 未反應 部分을 씻어낸 후 사진 촬영하였다.

結果 및 考察

1. 蛹血림프 Vitellogenin 및 卵黃素(Vitellin)의 分離

Eri蠶(*Philosamia cynthia*)의 vitellogenin分離를 위해 Chino등(1969, 1977)이 확립한 方法에 준하여 DE-AE-cellulose column chromatography에 의해 누에의 蛹血림프 vitellogenin과 卵黃素를 elution한 過程은 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 즉, 인산완충용액 (pH6.0)에 의한 첫번째 elution에서는 lipophorin I에 해당 하는 작은 peak가 나타나고 그후 0.25M KCl이 포함된 두번째 인산완충용액으로 바꾸어 elution했을 때 더욱 많은 量의 蛹血림프 vitellogenin 또는 卵黃素에 해당 하는 peak가 같은 모양으로 예리하게 分離되었다.

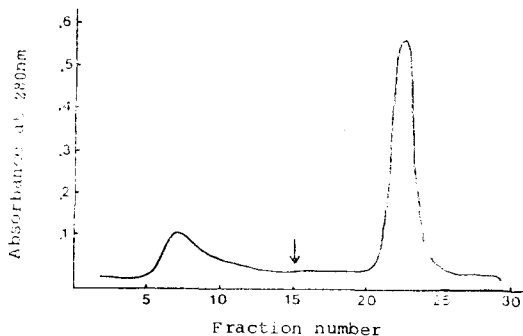


Fig. 1. Typical absorbance pattern of pupal hemolymph vitellogenin and vitellin in DEAE-cellulose column chromatography. Arrow (\downarrow) indicates the change of elution buffer.

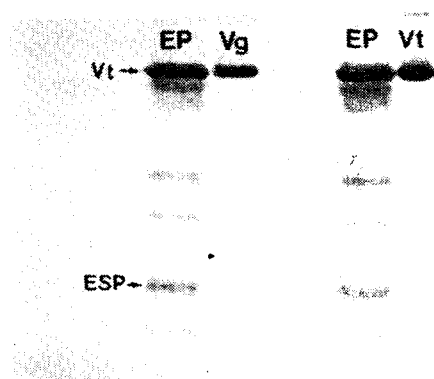


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of pupal hemolymph vitellogenin (Vg), vitellin (Vt) and crude egg protein (EP). ESP: Egg specific protein.

위에서 分離된 蛹血림프 vitellogenin과 卵黃素에 해당하는 fraction을 수집하여 冷凍乾燥法에 의해 濃縮한 후 polyacrylamide gel 電氣泳動에 의해 純粹성을 확인한 結果는 Fig. 2에 單一 band로 나타난 바와 같이 이들이 거의 순수하게 分離되었음을 알 수 있다. 따라서 *Philosamia cynthia*의 血림프 vitellogenin의 分離를 위한 DEAE-cellulose column chromatography 方法이 家蠶의 血림프 vitellogenin과 卵黃素의 分離에도 適用할 수 있다고 하겠다.

井口·中井(1978)는 누에의 蛹血림프와 卵黃蛋白質을 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動에 의해 分析한 結果, 血림프 vitellogenin에는 分子量과 아미노酸 組成이 다른 두개의 蛋白質이 存在한다고 推定하였다. 그 뒤 Izumi등 (1980)은 天然卵黃素의 分子量은 약 440KDa이고 電子顯微鏡的 관찰에 의해 直徑이 13nm 정도인 球形 粒子로 되어 있다고 하였으며, SDS-PAGE 의한 分析 結果 卵黃素는 分子量 180KDa와 42KDa 정도인 두 種類의 subunit으로 構成되어 있다고 하였다. 文등 (1986)은 卵黃素는 分子量 약 186KDa의 H-鎖와 41KDa의 L-鎖 등 두가지 subunit으로 구성 되었다고 하였으며 Zhu등 (1986)은 chromatography法에 의한 分析에서 native vitellin의 分子量은 420KDa이고 이것은 178KDa의 heavy subunit과 43KDa의 light subunit가 각각 2개씩 있는 tetramer라고 하였다. 이렇게 研究者에 따라 分子量에 약간의 차이가 있으나 누에 卵黃素의 large subunit는 180KDa내외이고 small subunit는 42KDa 내외이며 native vitellin은 分子量이 420~440KDa인 tetramer인 것으로 推定된다. 한편 native vitellin을 構成하는 두개의 subunit는 서로 다른 mRNA에 의해 coding됨이 밝혀졌다(Izumi와 Tomino, 1983).

Kunkel과 Nordin(1985)은 最近까지 報告된 16種의 昆蟲 卵黃素 또는 血림프 vitellogenin은 large subunit와 small subunit의 두가지로 構成되는 type I이 大部分이고 몇 種의 昆蟲 卵黃素는 small subunit만으로 된 type II 또는 large subunit만으로 構成되는 type III에 속한다고 하였는데 家蠶의 卵黃素는 type I에 속한다고 하겠다.

昆蟲의 vitellogenin은 일반적으로 成蟲의 血림프中에서 檢出되지만(Wyatt와 Pan, 1978), Ono등 (1975)은 누에에서의 vitellogenin 合成은 蛹化後에 시작된다고 하였다. 누에의 vitellogenin은 蛹化直後에는 血림프內 可溶性蛋白質의 5%에 불과하지만 점차 增加하여 羽化直後에는 成蟲 全體蛋白質의 약 40%를 차지한다(Ogawa와 Tojo, 1981).

귀뚜라미類등 몇가지 昆蟲에서 vitellogenin 合成은

幼若호르몬에 의해 誘導되고(Benford 1985; Engelman, 1979; Pan과 Wyatt, 1976), 모기類 등에서는 20-hydroxyecdysone에 의해 誘起된다고 알려져 있다(Bownes 1982; Gemmill등, 1986). 누에의 경우 幼蟲 血림프中의 貯藏蛋白質은 幼若호르몬에 의해 合成이 抑制된다는 報告는 있으나(Tojo등, 1981), 누에의 vitellogenin 合成에 昆蟲호르몬이 직접 參與하는가는 아직 分明하지 않다(茅野·富野, 1984). Chino등 (1976, 1981)은 *Philosamia cynthia*의 蛹血림프 lipophorin II는 vitellogenin과 같음을 確認하고 이는 탄화수소, cholesterol과 diglyceride를 운반하는 機能도 가진다고 하였다.

2. 蛹血림프 Vitellogenin과 卵黃素의 免疫學的 特性

누에의 암번데기 血림프蛋白質과 可溶性 卵蛋白質의 抗血清에 대한 血림프 vitellogenin과 卵黃素의 Ouchterlony 二重 免疫擴散法에 의한 反應特性을 보면 Fig. 3과 같다.

Fig. 3-A에서 보는 바와 같이 卵黃蛋白質의 抗血清에 대해 암수 幼蟲血림프나 수번데기 血림프에는 나타나지 않고 卵黃蛋白質과 암번데기 血림프에만 생기는 沈降線은 vitellogenin과 卵黃素에 해당하는 것이라고 하겠는데 이들이 卵黃蛋白質과 암번데기 血림프사이에서 융합하는 것으로 보아 두 蛋白質은 免疫學上 같은 것임을 알 수 있다. 이 그림에서 암수 幼蟲血림프와 蛹血림프 및 卵黃蛋白質에 共通의 形成된 沈降線은 이들 모두에 存在하는 血림프主蛋白質 또는 30 KDa蛋白質에 相應하는 것으로 볼 수 있다. Chino등 (1977)의 方法에 따라 DEAE-cellulose column chromatography로 分離한 血림프 vitellogenin과 卵黃素는 암번데기 血림프의 抗血清에 대한 沈降線이 서로 融合하므로 (Fig. 3-B) 純粹分離된 血림프 vitellogenin과 卵黃素는 免疫學的으로 同一한 蛋白質이라고 判斷된다.

Izumi등 (1980)은 누에의 卵黃素와 이의 前驅物質인 血림프 vitellogenin은 그 polypeptide의 基本構造에 差異가 인정되지 않는다고 하였으며, 다른 昆蟲에 있어서도 兩者間에는 構造의 또는 免疫學的으로 差異가 거의 없다는 報告가 많이 있다(Chen등, 1978; Imboden과 Law, 1983; Hagedorn과 Kunkel, 1979). 그러나 *Eri蠶(Philosamia cynthia)*, Chino등, 1977)과 풀무치 (*Locusta migratoria*, Chinzei, 1981)에 대한 研究結果 vitellogenin이 卵黃素보다 더 많은 diglyceride를 含有한다는 報告로 보아 兩者는 脂質含量과 인산화 과정에서 多少 差異가 있을 것으로 추측된다. 이런 事實은 昆蟲의 vitellogenin이 脂質運搬體로도 機能하고 있음을 시사하며, 最近 이들의 構造와 model에 대한 研究

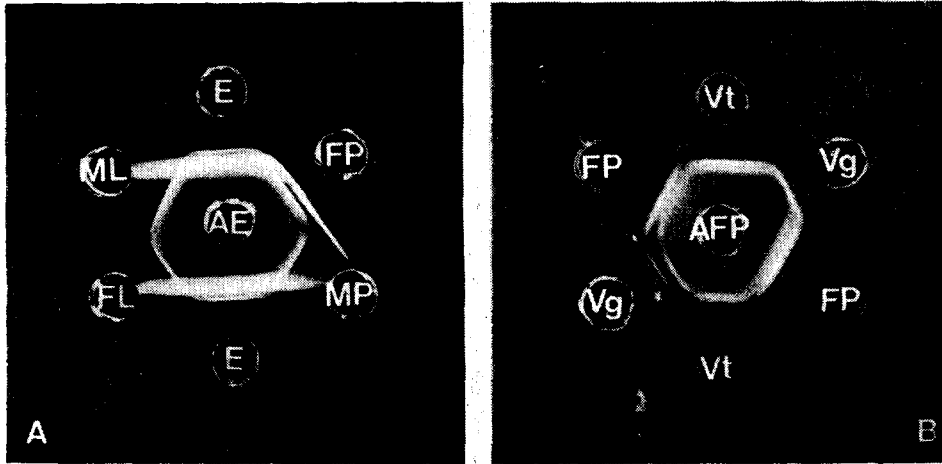


Fig. 3. Ouchterlony's double immuno-diffusion test. Every well contained 20 μ l of sample.

AE : Antiserum against crude egg proteins
 E : Crude egg proteins
 MP : Male pupal hemolymph
 ML : Male larval hemolymph
 Vt : Vitellin

FP : Female pupal hemolymph
 FL : Female larval hemolymph
 AFP: Antiserum against female hemolymph proteins
 Vg : Pupal hemolymph vitellogenin

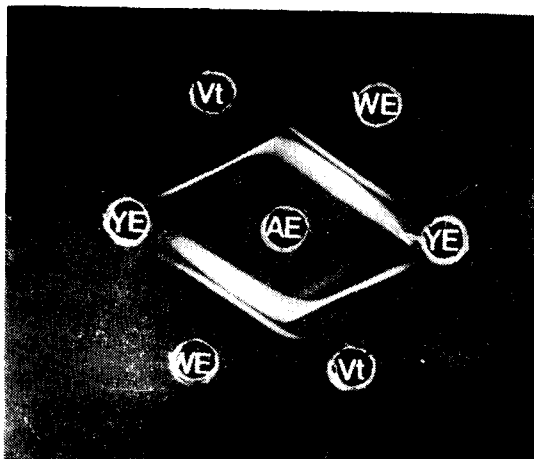


Fig. 4. Ouchterlony's double immuno-diffusion test. Every well contained 20 μ l of sample.

AE: Antiserum against soluble egg proteins
 Vt: Vitellin of *Bombyx mori*
 WE: Soluble egg proteins of *Bombyx mandarina*.
 YE: Soluble egg proteins of *Antheraea yamamai*

結果도 報告되어 있다(茅野 1987; Shapiro 등, 1984).

한편, 家蠶(*Bombyx mori*)과 그 近緣昆蟲인 桑蠶(*Bombyx mandarina*) 및 天蠶(*Antheraea yamamai*)의 羽化前後의 卵黃蛋白質間 免疫反應의 特性을 比較한 結果는 Fig. 4에 表示하였다. Ouchterlony의 二重

免疫擴散方法에 따라 1.5% agarose gel의 가운데에 위치한 家蠶의 卵黃蛋白質에 대한 抗血清에 대해 桑蠶의 卵黃蛋白質에는 家蠶의 卵黃素에 해당하는 沈降織이 약간 넓게 퍼져있기는 하지만 가지고 있고 또하나의 共通沈降織을 나타내어 家蠶과 桑蠶과는 近緣昆蟲임을 알 수 있다. 그러나 家蠶의 卵蛋白質에 대한 抗血清과 天蠶의 卵蛋白質 사이에는 沈降反應이 생기지 않아 서로 類緣關係가 없음을 나타내었다. 한편 家蠶 卵黃素의 抗血清에 대해 에리蠶(*Philosamia cynthia*)의 血淸프 vitellogenin은 免疫反應을 나타내었다고 하였다 (Izumi 등 1980).

3. 수누에에의 卵巢移植과 卵黃素의 生成關係

四眠脫皮후의 누에를 12시간 程度 絶食시킨 후 암누에의 卵巢를 摘出하여 精巢를 제거한 수누에에 移植하여 成長, 羽化한 수나방으로 부터 正常的인 암나방에 비해 $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{4}$ 程度에 해당하는 數의 누에알을 얻을 수 있었다. 수컷에서 자란 卵巢에서 生成된 卵黃蛋白質을 正常卵과 다른 암컷에 移植한 卵巢에서 생긴 卵黃蛋白質과 polyacrylamide gel 電氣泳動에 의해 比較한 結果는 Fig. 5와 같다.

수누에에서 자란 卵巢의 알에서 抽出한 卵黃蛋白質을 암누에에서 자란 正常卵의 그것과 比較하면 血淸프 主蛋白質(Major Hemolymph Protein, MHP) 또는 30 KDa蛋白質과 卵特異蛋白質(Egg Specific Protein, ESP)에서는 서로 差異가 없는 反面에, 수누에에서 자란 卵巢의 알에서 얻은 卵黃蛋白質에는 正常卵에서 약 40%

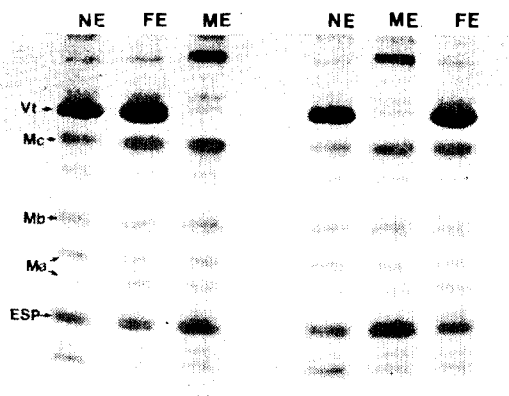


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins from normal eggs (NE), eggs produced from ovaries transplanted into female (FE) and male host (ME).

Vt: Vitellin

Ma, Mb, Mc: Major hemolymph proteins a, b and c.

ESP: Egg specific protein

를 차지하는 卵黃素에 해당하는蛋白質 band는 거의 나타나지 않았다. 이것은 다른 昆蟲과 마찬가지로 누에의 卵黃素 암번데기의 脂肪體에서만 合成되어 血림프에 放出되는 vitellogenin이 그 前驅物質이며, 이것이 卵巢에 吸收되어 生成된다(Yamashita · Irie, 1980)는 事實로 미루어보아 누에의 수컷에서 자란 卵巢의 알에 卵黃素가 缺如된 것은 수컷의 脂肪體에서는 vitellogenin을 거의 合成할 수 없다는 것을 말하는 것이다

그러나 血림프主蛋白質 또는 30KDa 蛋白質은 암컷 및 수컷의 脂肪體에서 合成되어 血림프에 放出되며 누에알에도 存在하는 것들이고 (Seong 등, 1985; Izumi 등, 1981), 卵特異蛋白質은 卵巢內的 卵胞細胞에서 合成되어 卵黃蛋白質의 일부가 되는 것이므로 (Irie와 Yamashita, 1983) 수컷에서 자란 卵巢의 알에도 나타나는 것이다. 한편, 다른 個體의 암컷에 移植한 卵巢의 卵과 正常卵의 蛋白質 사이에는 電氣泳動의으로 差異가 없으므로 卵巢移植은 卵黃蛋白質의 合成에 영향을 주지 않는다고 하겠다.

수누에에 移植된 卵巢로부터 生成된 卵黃蛋白質의 電氣泳動像의 卵黃素에 해당하는 位置에 약한 band가 나타났다(Fig. 5). 한편 암컷에서 生成된 卵黃蛋白質의 抗血清에 대해 수컷이 生成한 卵黃蛋白質을 正常卵의 그것과 二重免疫擴散反應으로 살펴보면 수나방에서 자란 卵巢의 알에서도 卵黃素에 해당하는 沈降線이 약하게나마 나타났다(Fig. 6). Zhu 등(1986)은 수누에에

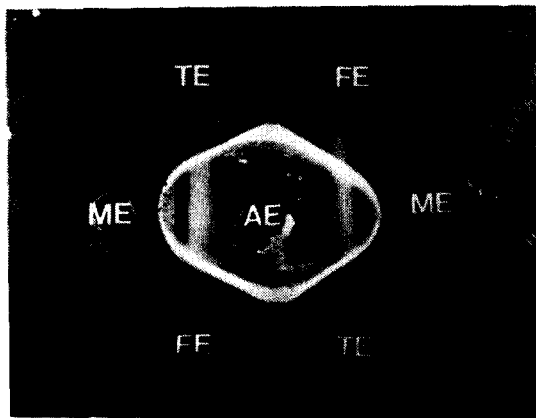


Fig. 6. Ouchterlony's double immunodiffusion analysis. The center well contained 20 μ l of anti-serum against egg proteins (AE).

TE: Normal soluble egg-proteins

FE: Soluble egg-proteins from ovaries transplanted into female host

ME: Soluble egg-proteins produced in male host

移植한 卵巢에서 자란 알에도 正常卵의 5% 이하에 해당하는 卵黃素가 生成되었다고 했는데, 수컷이 生成한 卵黃蛋白質에도 卵黃素와 免疫學的으로 同一한 蛋白質이 存在하는가와 이것이 어떻게 生成되었는가에 대해서는 今後 研究되어야 할 課題라고 생각된다. 한편, 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서는 20-hydroxyecdysone의 處理에 의해 수컷의 脂肪體에서도 卵黃蛋白質 gene의 轉寫가 일어난다고 하였다(Bownes, 1982).

Yamashita와 Irie(1980)는 精巢를 除去한 5齡 幼蟲에 未成熟卵巢를 移植하여 수컷의 血液 環境下에서 成熟한 卵도 單位發生處理(46°C 溫湯에 18分間 浸漬)에 의해 胚子 및 後胚子 發育이 正常的으로 일어나므로 卵黃素가 卵成熟 및 胚子發育에 반드시 必要한 것은 아니라고 하였다. 또한 수컷에 卵巢만 移植하였을 때는 알에 卵黃素가 缺如되지만 卵巢와 암컷의 脂肪體를 同時에 移植한 수컷에서 生成된 알에는 卵黃素가 蓄積되는 것으로 보아 卵黃素의 合成에는 암컷의 脂肪體에서 合成된 vitellogenin이 必要하다고 하였다(Miwa와 Yamashita, 1985).

4. 胚發生에 따른 卵黃素의 量的變化

産卵直後の 누에알의 可溶性 蛋白質을 polyacrylamide gel을 利用하여 電氣泳動을 하면 10여개의 蛋白質 band가 檢出된다. 이들중 가장 많은 含量을 나타내는 部分이 卵黃素(약 40%)로 卵黃蛋白質의 主成分이다. 그리고 移動도가 빠른 部位에 幼蟲이나 번데기 血림프

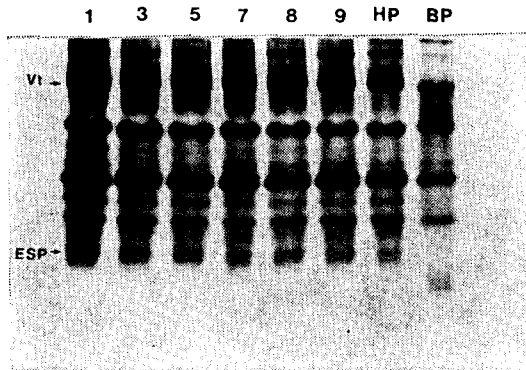


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble egg proteins during embryogenesis. The same amount of samples were applied.
1-9: One to nine days after the beginning of embryogenesis,
Hp: Head pigment stage,
Bp: Body pigment stage,
Vt: Vitellin,
ESP: Egg specific protein.

의 단백질 중에는 나타나지 않고, 卵黃蛋白質에만 존재하는 卵特異蛋白質(Egg Specific Protein, ESP) band가 있다. 이들 각 단백질 band의 胚發育 段階別 量的 變化過程을 보면 Fig. 7과 같다.

越年卵을 알개기를 시작함과 동시에 卵黃內的 卵黃素含量은 漸次的으로 減少하기 시작하여 點青卵때까지 어느정도 유지하다가 孵化直前인 催青卵때에 急速하게 減少한 반면, 卵特異蛋白質(ESP)은 器官分化가 시작되는 알개기 7일째부터 顯著的 減少를 보이고 孵化 2日前까지는 器官形成에 거의 모두 利用되는 것 같다. 따라서 卵特異蛋白質은 卵黃素보다 胚發育 初期부터 利用된다고 생각된다. 이는 Irie와 Yamashita(1980, 1983)가 ESP는 初期 胚發生에 더욱 重要的 役割을 한다는 報告와 잘 一致한다. 한편 卵黃素와 ESP를 除外한 다른 貯藏性 蛋白質들은 孵化 直前日까지 약간씩 줄어들기는 하지만 큰 變化가 없었다.

Irie와 Yamashita(1983)는 ESP의 分子量이 125KDa로 55KDa인 subunit로 構成되었다고 하였으나, Zhu 등(1986)은 ESP의 變性を 最小化하여 分析한 결과, heavy subunit(72KDa) 두개와 light subunit(43KDa) 하나로 構成된 trimer(225KDa)라고 하였다. ESP의 構成要素인 72KDa와 64KDa 두개의 subunit는 胚發育 段階에 따라 서로 다른 變化樣相을 나타내고 vitellogenic ovary에서 分離한 未成熟 ESP는 3개의 72KDa subunit으로 構成되었다고 하였으며(Indrasith 등,

1988), Takahashi(1987)는 ESP가 卵巢內 여러 곳에서 인산화된다고 하였다. 한편 Furusawa와 Indrasith(1987)는 最近報告를 통해 누에알의 休眠末期에 ESP의 含量은 減少하고 卵黃素의 量이 增加하는 것을 관찰하고 이들이 누에알의 休眠에 關여하는 것이라고 推定하였다.

摘 要

누에 卵黃蛋白質의 主成分인 卵黃素(vitellin)를 分離하고 그 免疫反應의 特性과 卵巢 移植과의 關係 및 胚發生中의 量的 變化를 調査한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 누에의 蛹血液 vitellogenin과 卵黃素는 遠心分離에 이은 DEAE-cellulose column chromatography에 의해 거의 純粹하게 分離되었으며 두 蛋白質의 polyacrylamide gel 電氣泳動上의 移動도는 같았다.

2. 누에의 卵黃素와 이의 前驅物質인 蛹血 립프 vitellogenin은 免疫反應의 으로 서로 同質임이 確認되었고, 家蠶의 近緣昆蟲인 桑蠶(*Bombyx mandarina*)의 卵黃蛋白質에는 家蠶의 卵黃素와 免疫學的으로 같은 反應을 나타낸 抗原이 있는 반면, 天蠶(*Antheraea yama-mai*)의 卵黃蛋白質에는 家蠶과의 共通抗原이 없었다.

3. 수누에에 移植한 卵巢에서 生成된 卵黃蛋白質에는 卵黃素가 缺如됨이 確認되어 卵黃素의 合成에는 卵巢 이외의 다른 암컷 器官에서 生成된 前驅物質이 必要함을 나타내었다.

4. 胚發生中의 卵黃素는 胚子發育 後期에 주로 器官의 形成에 利用되어 胚子發育 初期부터 꾸준하게 利用되는 卵特異蛋白質(ESP)과는 利用上 다른 特性을 보였다.

引 用 文 獻

- Benford H.H. and J.T. Bradley (1985) Early detection and juvenile hormone dependence of cricket vitellogenin. *J. Insect Physiol.* 31:109-116.
Borovsky D. and E. Van Handel (1980) Synthesis of ovary specific proteins in mosquitoes. *Int. J. Invert. Reprod.* 2:153-163.
Bownes M. (1982) The role of 20-hydroxy-ecdysone in yolk polypeptide synthesis by male and female fat bodies of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 28:317-328.
Chen T.T., P.W. Strahlendorf and G.R. Wyatt

- (1978) Vitellin and vitellogenin from locusts (*Locusta migratoria*)—Properties and post-translational modification in the fat body. *J. Biol. Chem.* 253: 5325-5331.
- Chino H., S. Murakami and K. Harashima (1969) Diglyceride-carrying-lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 176:1-26.
- Chino H., M. Yamagata and K. Takahashi (1976) Isolation and characterization of insect vitellogenin. Its identity with haemolymph lipoprotein II. *Biochim. Biophys. Acta.* 441:349-353.
- Chino H., M. Yamagata and S. Sato (1977) Further characterization of Lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.* 7: 125-131.
- Chino H., R.G.H., Downer G.R. Wyatt and L.I. Gilbert (1981) Lipophorins—a major class of lipoproteins of insect hemolymph. *Insect Biochem.* 11:491.
- 茅野春雄(1987) Lipophorinと昆蟲. 蛋核醇 32:1413-1421.
- 茅野春雄・富野士良(1984) 血液タンパク質とその役割. 家蠶生化学(伊藤智夫編著). 裳華房, 92-129.
- Chinzei Y., H. Chino and G.R. Wyatt (1981) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 11:1-7.
- Engelmann F. (1979) Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.* 14:49-107.
- Furusawa T. and L.S. Indrasith (1987) Quantitative and qualitative changes of polypeptides of egg-specific protein and vitellin depending on the diapause state of *Bombyx* eggs exposed to lower temperature. *J. Seric. Sci. Jpn.* 56:467-473.
- Gemmill R.M., M. Hamblin, R.L. Glaser, J.V. Racioppi, J.L. Marx, B.N. White, J.M. Calvo, M.F. Wolfner and H.H. Hagedorn (1986) Isolation of mosquito vitellogenin genes and induction of expression by 20-hydroxyecdysone. *Insect Biochem.* 16: 761-774.
- Hagedorn H.H. and J.G. Kunkel (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Ent.* 24:475-505.
- Harnish D.G. and B.N. White (1982) Insect vitellins: Identification, purification, and characterization from eight orders. *J. Exp. Zool.* 220:1-10.
- Imboden H. and J.H. Law (1983) Heterogeneity of vitellins and vitellogenins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. Time course of vitellogenin appearance in the hemolymph of the adult female. *Insect Biochem.* 13:151-162.
- Indrasith L.S., T. Furusawa, M. Shikata and O. Yamashita (1987) Limited degradation of vitellin and egg-specific protein in *Bombyx* eggs during embryogenesis. *Insect Biochem.* 17:539-545.
- Indrasith L.S., T. Sasaki, T. Yaginuma and O. Yamashita (1988) The occurrence of a premature form of egg-specific protein in vitellogenic follicles of *Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol. B.* 158:1-7.
- 井口民夫・中井正憲(1978) 家蠶のピテロジェニンに関する研究 I. 同定とアミノ酸組成. 蠶試報 27:579-593.
- Irie K. and O. Yamashita (1980) Changes in vitellin and other yolk proteins during embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 26:811-817.
- Irie K. and O. Yamashita (1983) Egg specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.* 13:71-80.
- Izumi S. and S. Tomino (1983) Vitellogenin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*: Separate mRNAs encode two subunits of vitellogenin. *Insect Biochem.* 13:81-85.
- Izumi S., S. Tomino and H. Chino (1980) Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10:199-208.
- Kunkel J.G. and J.H. Nordin (1985) Yolk proteins. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Gilbert L.I. & G.A. Kerkut eds.). Pergamon Press, Vol. 1. 83-111.
- Miwa H. and O. Yamashita (1985) Controlled accumulation of vitellin in *Bombyx* eggs. *Int. J. Invert. Reprod. Develop.* 8:193-196.
- 文在裕, 尹馨珠, 李相夢(1986) 人工飼育蠶에 있어서 卵黃蛋白質(Vitellogenin)의 同定과 그 分子量 推定. 서울大農學研究 11:97-103.
- 文在裕, 孫基旭(1988) 人工飼料의 營養物質 添加가 누에의 vitellogenin 및 vitellin 含量에 미치는 影響.

- 서울大農學研究 13:11-16.
- Ogawa K. and S. Tojo (1981) Quantitative changes of storage proteins and vitellogenin during the pupal-adult development in the silkworm, *Bombyx mori*. Appl. Ent. Zool. 16:288-296.
- Ono S., H. Nagayama and K. Shimura (1975) The occurrence and synthesis of female- and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 5:313-329.
- Pan M.L. and G.R. Wyatt (1976) Control of vitellogenin synthesis in the Monarch butterfly by juvenile hormone. Develop. Biol. 54:127-134.
- Shapiro J.P., P.S. Keim and J.H. Law (1984) Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein. J. Biol. Chem. 259:3680-3685.
- Takahashi S.Y. (1987) Studies on the phosphorylation of ovarian proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 17:141-152.
- Tojo S., K. Kiguchi and S. Kimura (1981) Hormonal control of storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 27:491-497.
- Wojchowski D.M. and J.G. Kunkel (1987) Purification of two distinct oocyte vitellins and identification of other corresponding vitellogenins in fat body and hemolymph of *Blaberus discoidalis*. Insect Biochem. 17:189-198.
- Wyatt G.R. and M.L. Pan (1978) Insect Plasma Proteins. Ann. Rev. Biochem. 47:779-817.
- Yamashita O. and K. Irie (1980) Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male host of silkworm. Nature 283:385-386.
- Yamashita O. (1986) Yolk protein system in *Bombyx* eggs: Synthesis and degradation of egg-specific protein. Adv. Invert. reprod. 4:79-84.
- Zhu J., L.S. Indrasith and O. Yamashita (1986) Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30KDa protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. Biochim. Biophys. Acta. 882:427-436.