

天蠶(*Antheraea yamamai*) Vitellin의 分離와 生化學的 特性에 관한 研究

II. Vitellin의 生化學的 特性

金啓明 · 文在裕* · 李相夢 · 尹馨珠
農村振興廳 蠶業試驗場 · *서울대학교 農科大學

Studies on the Purification and Biochemical Properties of Vitellin in the *Antheraea yamamai* Guerin-Meneville

II. Biochemical Properties of Vitellin

Kye Myeong Kim, Jae Yu Moon,* Sang Mong Lee and Hyung Joo Yoon
Sericultural Experiment Station, R.D.A. Suwon, Korea.
*College of Agriculture, Seoul National University Suwon, Korea.

Summary

Antheraea yamamai vitellin was purified from matured eggs by polyacrylamide gel electrophoresis for characterization of its biochemical properties: molecular weight, sugar and lipid composition, amino acid composition and electron microscopic morphology, etc.

1. *A. yamamai* vitellin was composed of two subunits, large and small, showing different mobility in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
2. The molecular weight of the vitellin was estimated to be approximately 450,000 dalton and the large and small subunits were 174,000 dalton and 44,000 dalton, respectively.
3. The vitellin seemed to be a glycolipoprotein since it showed a positive reaction to coomassie brilliant blue, sudan black B and PAS staining. Both subunits were similar in this aspect.
4. Lipid of the vitellin revealed several different types including saturated lipids.
5. When the vitellin was incubated at 70°C for 60 minutes its apoprotein still cross-reacted to the specific antiserum to the native vitellin. Its sugar components were also detected by PAS staining, but its lipid portion was not detected by sudan black B staining.
6. Its amino acid composition was similar to that of other insects, but its glycine content was peculiarly very high.
7. The vitellin molecule was spherical in shape with a diameter of 14 ± 0.8 nm by negatively stained electron microscopy.

緒 論

Chino 등(1969, 1976)은 DEAE-Cellulose column chromatography로 Eri-蠶(*Philosamia cynthia*)의 변

태기 體液에서 lipoproteins I 과 II 를 각각 분리하여
분자량의 측정과 電子顯微鏡 관찰을 한 결과, 이들 중
에서 lipoprotein II 가 雌性 蛋白質인 vitellogenin임을
밝혔다. 또한, 井口와 中井(1978)는 SDS-polyacryla-
mide gel 電氣泳動으로 家蠶의 體液과 卵巢중의 蛋白

質중에서 vitellogenin을 분리, 分子량이 큰것(182,000d)과 작은 것(46,500d)을 얻었는데, 이들중 分子량이 작은 것은 큰 것의 subunit가 아니며, 이들의 아미노酸 조성은 다른 昆蟲 vitellogenin의 아미노酸 조성과 달라서 種特異性이 있음을 알았다.

Izumi 등(1980b)은 DEAE-cellulose column chromatography로 家蠶의 卵母細胞에서 vitellin을 분리·정제한 결과 vitellin은 直徑이 13nm이고 球形인 glycolipoprotein이며 그 分子량이 440,000d로서 2개의 subunit로 구분되며 큰것은 分子량이 180,000d이고 작은것은 42,000d라고 추정하였다. 즉, native vitellin 分子는 이들 두 subunit가 각각 2分子로 구성된 4量體로서 分子량이 큰 H鎖와 分子량이 적은 L鎖의 polypeptide鎖로 구성된다고 밝혔다.

Vitellogenin과 vitellin의 기본구조의 차이는 아직 명확하게는 밝혀져 있지 않으나(Hagedorn과 Kunkel, 1979), 芽野(1987)는 바퀴科的 lipophorin에서 얻어진 결과를 기준으로 바퀴科的 lipophorin分子的 입체구조 모형을 제시하고 있고, 卵內의 함량이 있어서는 Eri-蠶(Chino 등, 1977)과 풀무치(*Locusta migratoria*; Chinzei 등, 1981)에서 다소의 차이가 있다고 보고하고 있다.

한편 Tojo 등(1980)에 의하면 家蠶의 貯藏蛋白質은 I과 II의 두 종류가 있는데 이들중의 I이 性特異性이 있다고 하였으며 Mine 등(1983)은 I의 함성이 높으면 vitellogenin의 함성도 높고 I의 함성이 없으면 vitellogenin의 함성도 없다고 함으로서 貯藏蛋白質 I과 vitellogenin과의 밀접한 관계를 시사 하였으며, Ogawa와 Tojo(1981)가 아미노酸 組成比較로 이를 뒷받침 하고 있다. 이와 같이 고치를 짓는 여러 昆蟲에서는 분리·정제한 vitellin의 生化學의 特性이 많이 밝혀져 있으나 天蠶 vitellin의 분리·정제와 더불어 生化學의 特性에 대해서는 아직 연구된 바 없다. 따라서 本 研究에서는 前報에서 분리·정제한 天蠶 vitellin의 分子量, 糖과 脂質의 成分 검색 및 아미노酸 조성을 조사 하였다. 또한 SDS-PAGE 방법으로 subunit의 유무 및 이 subunit의 糖과 脂質의 성분 함유 여부도 검색 하였다. 한편 電子顯微鏡의 관찰 및 熱處理에 의한 天蠶 vitellin의 耐熱性과 糖 및 脂質의 變性도 조사 하였다.

材料 및 方法

1. 分子量 推定

天然蛋白質의 分子量 추정을 위한 PAGE는 Hedrick

과 Smith(1968)의 방법에 준하였다. gel 농도는 4.5%에서부터 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 및 10.0%였으며 0.005M tris-0.038M glycine 완충액을 사용하여 gel tube당 농축 gel은 1mA, 분리 gel은 2mA의 전류를 通電하였다.

標準蛋白質로서는 α -lactalbumin(bovine milk, MW=14,200), egg albumin(chicken egg, MW=45,000), bovine serum(monomer; MW=66,000, dimer; MW=132,000), carbonic anhydrase(bovine erythrocytes, MW=29,000), urease(Jackbean trimer; MW=272,000, Jack bean hexamer; MW=545,000)을 사용하였다(Sigma社 製品).

SDS-PAGE는 Weber와 Osborn(1969) 및 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시 하였으며, gel의 농도는 7%(高分子用)와 11%(低分子用)로 하였고 0.1% SDS가 포함된 0.025M tris-0.19M glycine 완충액을 사용하였다.

標準蛋白質은 高分子用으로 bovine plasma albumin(MW=66,000), phosphorylase B(MW=97,400), β -galactosidase(MW=116,000), myosin(MW=205,000)을, 그리고 低分子用으로 bovine albumin(MW=66,000), egg albumin(MW=45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(MW=36,000), carbonic anhydrase(MW=29,000), trypsinogen(MW=24,000), soybean trypsin inhibitor(MW=20,100) 및 α -lactalbumin(MW=14,200)을 각각 사용 하였다(Sigma社 제품).

2. 糖 및 脂質蛋白質 同定

Vitellin內의 糖은 Periodic酸과 Schiff(PAS)試藥(Zacharius 등, 1969)으로, 脂質은 sudan black B(Swahn, 1953)로 염색 하였다.

3. 熱處理

恒溫水槽를 이용 40~90°C의 범위에서 每 10°C마다 각각 10, 30, 60分間 처리하여 12,000rpm에서 10分間 遠心후 上澄液을 電氣泳動用 試料로 사용 하였으며, 電氣泳動은 前報에서와 같이 Davis(1964)의 方法에 準하여 실시하였다.

4. 電子顯微鏡 觀察

分離·精製된 vitellin을 농축시켜서 2% phosphotungstic acid로 negative 염색하여 투사전자현미경(日立社製作 HU-11E型)으로 관찰 하였다.

5. 아미노酸 分析

天蠶의 농축된 分離·精製 vitellin을 容量比 1:1의 6N-HCl로 25時間 加水分解시키고 rotary evaporator로 농축하여 일정량의 증류수로 용해시킨 다음 그의

50 μ l을 분注, 아미노酸自動分析機(Hitachi 835)로 분석 하였다.

6. 脂質分析

天蠶의 冷凍乾燥된 vitellin 54.4mg을 2ml의 증류수에 녹여서 38ml의 chloroform-methanol용액을 넣고 (2:1, V/V) 5°C에서 48시간 抽出한 후 0.7%의 生理食鹽水를 試料용액에 대하여 20%(V/V) 비율로 혼합한 후 잘 흔들어 5°C에서 1일간 보관 하였다. 분리된 上澄液은 糖分析用으로 사용하고 下層液은 rotary evaporator로 농축한 후 1ml의 chloroform-methanol 용액으로 희석, 薄層 chromatography에 사용하였다.

標準試藥으로는 monoolein, diolein, triolein 및 cholesteryl palmitate(Sigma社)를 썼으며, 展開溶媒로는 petroleum ether : diethyl ether : acetic acid=90 : 10 : 1(V/V/V) 사용하였으며, 發色試藥으로는 chromic acid : sulfuric acid=1 : 1(V/V)을 혼합하여 사용하였다.

7. 糖分析

天蠶의 分離·精製된 vitellin 1g에 6N-HCl 1ml를 넣고 110°C에서 16시간 加水分解하여 蒸溜수를 가하면서 rotary eraporator로 5회 반복 농축하였으며 chloroform-methanol용액 (2:1, V/V)으로 희석한 뒤 薄層 chromatography를 하였다.

板은 Kieselguhr G layer를 0.1M sodium dihydrogen phosphate 완충액(pH 5)과 섞어 TLC applicator를 이용 impregnating하여 사용하였고, 展開溶媒로는 n-butanol : acetone : phosphate(pH 5)=40 : 50 : 10(V/V/V)을 사용하였으며 發色試藥으로는 2N-H₂SO₄에 0.1%가 되게 orcinol을 혼합하여 부린후 100~110°C에서 10分間 發色시켰다. 標準試藥으로는 fructose, glucose, saccharose, mannose, arabinose 및 raffinose를 사용하였다.

結果 및 考察

1. Vitellin의 分子量 推定

1) Native 分子量

天蠶의 native vitellin의 分子量을 추정하기 위하여 Hedrick과 Smith(1968)의 방법에 따라 4.5%에서 10%까지 gel 농도를 8단계로 하여 이미 分子量을 알고 있는 標準蛋白質과 함께 polyacrylamide gel 電氣泳動하여 標準蛋白質別 gel 농도별 蛋白質 band의 移動도를 갖이고 檢量線을 구한 결과 標準蛋白質들의 回歸直線을 보면 α -lactalbumin(LA)은 $Y = -2.6792x + 202.033$, chicken egg albumin(AC)은 $Y = -5.6663x + 230.885$,

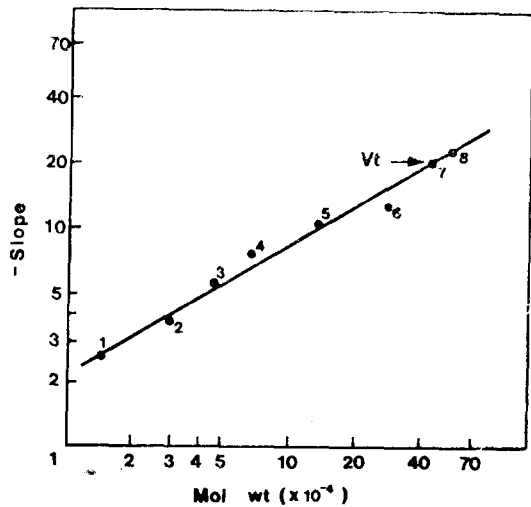


Fig. 1. Molecular weight estimation of *Antheraea yamamai* vitellin by native polyacrylamide gel electrophoresis. 1. LA; 2. CA; 3. AC; 4. AB(M); 5. AB(D); 6. UR(T); 7. Vt; 8. UR(A). See chapter I-1) of experimental results and discussion for abbreviation. Linear regression formula of Vt is $Y = 0.0000353125X + 3.83061$.

carbonic anhydrase(CA)는 $Y = -3.8401x + 178.168$, bovine serum monomer(ABM)은 $Y = -7.7734x + 240.244$, bovine serum dimer(ABD)는 $Y = -10.3009x + 239.852$, Jackbean trimer(URT)는 $Y = -12.5498x + 235.982$, Jackbean hexamer(URH)는 $Y = -22.9613x + 276.122$ 였으며 이 실험에서 알고자 하는 天蠶의 vitellin은 $Y = -20.5918x + 262.512$ 였다.

이 回歸直線의 기울기와 알고 있는 分子量을 가지고 2重 log-log방안지에 分子量 추정을 위한 回歸直線을 구하였다(그림 1). 이때 天蠶 vitellin은 기울기가 -20.5918이므로 이 점에서 分子量軸에 수직선을 그어 代數눈금을 읽는 방법으로 分子量을 측정한 결과 天蠶의 天然分子量은 약 450,000d인 것으로 추정되었다.

分子量은 그 분자가 가지고 있는 荷電경도와 그 분자의 크기에 따라 蛋白質 band의 이동에 영향을 받는데(Hedrick와 Smith, 1968), 본 실험에서 사용한 電氣泳動방법은 분자의 크기에 따른 영향은 거의 없으나 荷電異性體에 따라 약간의 영향이 있을 것으로 생각되는 부분을 최소화하는 방법(Hedrick과 Smith, 1968)으로서 材料 및 方法에서 제시한 방법을 활용하였다.

家蠶에 있어서는 Izumi 등(1980b)이 chino 등(1969)의 방법에 따라 rapid sedimentation평형법으로 agarose gel filtration을 한 뒤 chromatography에 의해 天然分

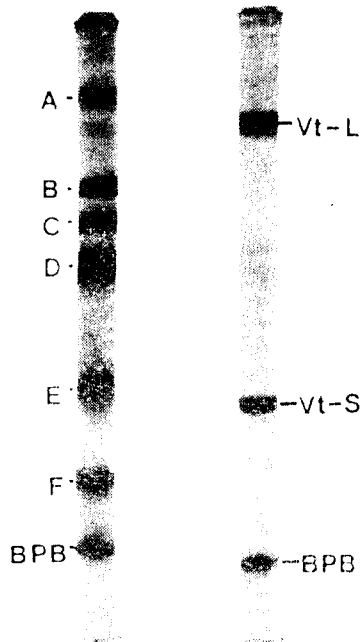


Fig. 2. SDS-PAGE for size estimation of two subunits of vitellin on 7% gel. Vt-L, large subunit of vitellin; Vt-S, small subunit of vitellin; B, β -galactosidase; C, phosphorylase-b; D, albumin bovine; BPB, bromophenol blue.

자량을 구한 결과 440,000d 정도인 것으로 추정 하였으며, 풀무치의 경우는 550,000d(Chen 등 1978), 마귀類는 560,000d(Koeppe와 Offengand, 1975) 정도라고 하므로 天蠶의 경우는 조사된 昆蟲들 보다는 작으나 家蠶과는 비슷 하였다.

2) Subunit의 分子量

Weber와 Osborn(1969) 및 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動을 실시한 결과, 天蠶의 vitellin은 두개의 subunit로 구성 되었음이 밝혀졌다(그림 2).

이 분리된 두개의 subunit중 蛋白質 band의 移動도가 느린 것을 large subunit(Vt-L), 빠른 것을 small subunit(Vt-S)로 구분하고 高分子用的 gel농도를 7%, 低分子用을 11%로 하여 이미 分子量을 알고 있는 標準蛋白質과 같이 電氣泳動하여 分子量을 구하였다(그림 3). 그 결과 large subunit는 $R_f=0.201$ 에서 分子量이 174,000d로, small subunit는 $R_f=0.347$ 에서 分子量이 44,000d로 각각 추정되었다. 이때 標準蛋白質중에는 몇개의 荷電異性體가 나타나는 것이 있는데 이럴 경우는 가장 높은 band의 移動도를 기준으로 하였다.

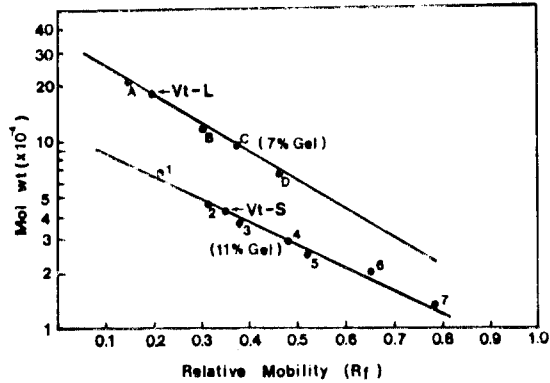


Fig. 3. Molecular weight estimation of large subunit (Vt-L) and small subunit(Vt-S) of *Antheraea yamamai* vitellin by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A, myosin(MW=205,000); B, β -galactosidase(MW=116,000); C, phosphorylase b (MW=97,400); D and 1, bovine albumin (MW=66,000); 2, egg albumin(MW=45,000); 3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(MW=36,000); 4, carbonic anhydrase(MW=29,000); 5, trypsinogen(MW=24,000); 6, soybean trypsin inhibitor(MW=20,100); 7, α -lactalbumin(MW=14,200).

家蠶의 경우 Izumi 등(1980b)은 天然 vitellin의 分子量이 440,000d이고 SDS-PAGE로 하였을 경우 分子量이 180,000d인 H鎖와 42,000d인 L鎖로 나누어지며 天然 vitellin은 두개의 subunit가 각각 2分子로 구성된 4量體라고 하였다. 또한 Izumi와 Tomino(1983)는 3H -leucine이 함유된 Grace의 培養液에 家蠶의 脂肪體를 배양하여 합성되는 subunit의 量을 측정한 결과 大小 subunit가 1:1의 비율임을 확인하여 天然 vitellin은 두개의 subunit가 1分子를 이룬 4量體라는 것을 증명 하였다.

한편 Harnish와 White(1982)는 그간에 조사된 昆蟲의 vitellin을 subunit의 종류에 따라서 large subunit와 small subunit가 같이 존재하는 I型和 small subunit만 존재하는 II型, 그리고 large subunit만 존재하는 III型の 세 종류로 區分 하였는데 이러한 분류 기준에 따르면 天蠶의 vitellin은 I型에 속한다.

2. Vitellin의 糖 및 脂質成分 檢索

1) 糖 및 脂質의 檢索

(1) 天然 vitellin

天蠶 vitellin分子에 糖이나 脂質 등 다른 물질이 附着되어 있는지를 알아보기 위해 染色反應을 檢討한 결과 coomassie brilliant blue(CBB)에서 5링 4인제 유

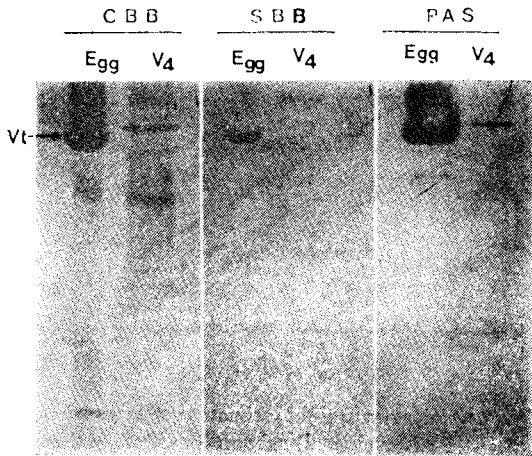


Fig. 4. Coomassie brilliant blue(CBB), sudan black B(SBB) and PAS staining after polyacrylamide slab gel electrophoresis. V4, the hemolymph of the four day old male larva of the fifth instar; Egg, egg extract protein; Vt, vitellin.

층에는 나타나지 않고 알페에만 나타난 vitellin band가 PAS 염색에서 赤色으로 그리고 sudan black B 염색에서 黑色으로 염색되는 것으로 보아 天蠶의 vitellin은 糖과 脂質成分이 함유되어 있는 glycolipoprotein임을 알 수 있었다(그림 4).

家蠶에 있어서도 glycolipoprotein으로 보고 되었다(Izumi 등, 1980b).

(2) Vitellin의 subunit

天蠶의 vitellin을 2%의 SDS, 5%의 2-mercaptoethanol 그리고 10%의 glycerol에 용해시켜서 37°C에

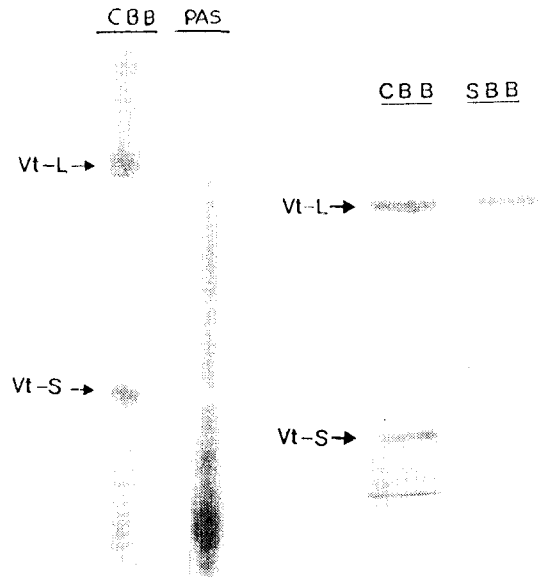


Fig. 5. Coomassie brilliant blue(CBB), sudan black B(SBB) and PAS staining of vitellin subunits after PAGE.

Vt, Vitellin; L, large subunit; S, small subunit.

서 2시간 처리한 뒤 電氣泳動을 하고, Grossman과 Neville(1971)의 방법으로 gel내의 SDS를 세척 제거한 뒤 PAS와 SBB로 염색하였다(그림 5). 그 결과 天蠶에서는 天然 vitellin과 마찬가지로 大小 subunit 모두 糖과 脂質成分을 가지고 있음이 밝혀졌다. 家蠶에 있어서도 vitellin의 subunit는 糖을 함유하고 있음이 報告되고 있다(Izumi 등 1980b). 그러나 이 경우에 試

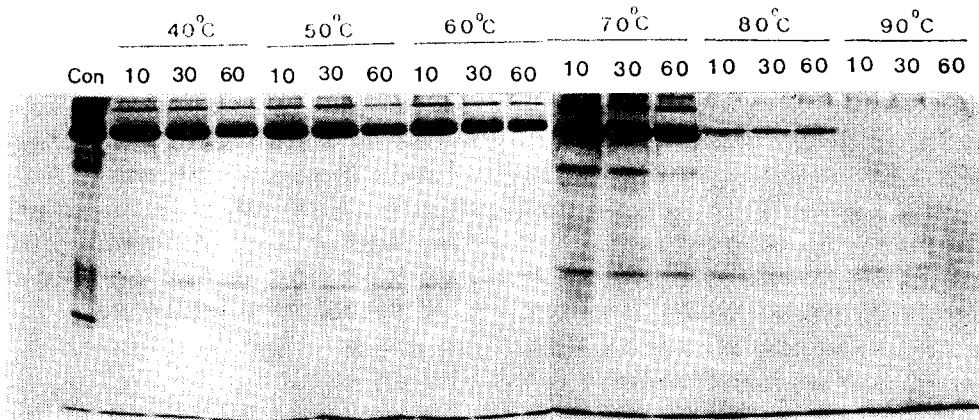


Fig. 6. Heat resistance of total egg extracts of *Antheraea yamamai*. Con, no heat treatment; 10, 30 and 60, exposed for 10, 30 and 60 minutes at corresponding temperature,

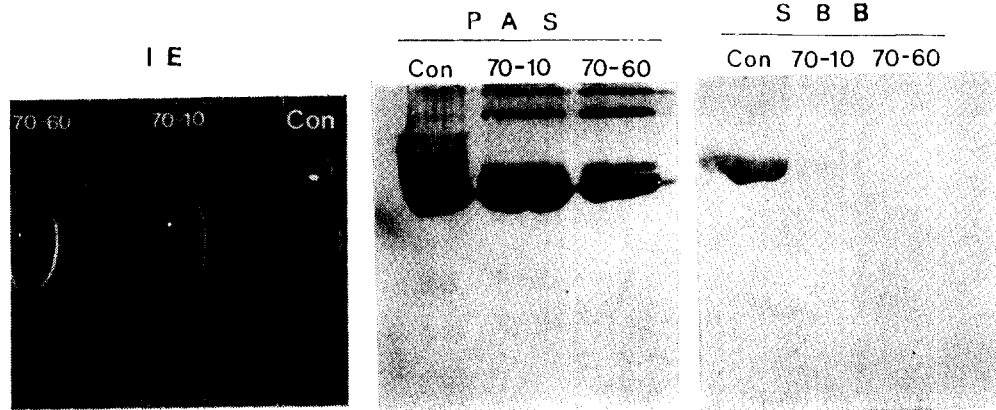


Fig. 7. Identification of heat-treated vitellin by immunoelectrophoresis(IE), PAS staining and sudan black B staining(SBB). Con, no treatment; 70~10, 10 minutes at 70°C; 70-60, 60 minutes at 70°C.

료를 2%의 SDS, 5%의 2-mercaptoethanol 및 10%의 glycerol에 용해시키면서 끓는물에 2분간加熱한 결과 large subunit에만 糖成分이 있음을 보고하였다. 그러나 small subunit에 대한 糖과 脂質成分의 함유 여부는 열에 대한 耐性이 약해서인지 또는 존재하지 않는 것인지 알 수 없었으며, 다른 昆蟲에서도 subunit의 脂質成分에 대해서는 보고 되어 있지 않다.

2) 糖 및 脂質의 耐熱性

天蠶 vitellin의 成分을 분석할때 열에 대한 糖이나 脂肪의 耐性을 알 필요가 있어서 vitellin의 熱에 대한 저항성을 조사하였다(그림 6).

일반적으로 蛋白質은 용액의 상태에서 50°C 이상이면 2次構造의 破壞로 變性を 일으킨다. 그러나 天蠶卵의 蛋白質은 대체로 熱에 대한 抵抗力이 강하여 vitellin을 위시하여 다른 부위의 蛋白質 band도 없어지지 않았다. 특히 vitellin band의 경우를 보면 80°C 이상에서는 전부 消失되었으나 70°C에서 60분까지는 band가 검출되었다.

한편 vitellin과 糖 및 脂質成分의 變性여부를 알아 보기 위해 70°C에 60분간 熱處理된 卵抽出物을 vitellin에 대한 抗血清을 사용하여 免疫電氣泳動을 실시한 결과(그림 7-IE), vitellin의 熱에 대한 안정성이 免疫學的으로 확인되었고 PAS와 SBB염색결과 糖 역시 70°C에 60분간 熱處理에도 확인되었으나 脂質은 70°C에 10분간 熱處理에 흔적만이 보였다. 즉, vitellin의 蛋白質과 糖 및 脂質은 70°C의 高溫에도 耐熱性이 있으며 脂質成分은 糖보다 熱에 다소 약함을 알 수 있었다.

3) 天然 vitellin의 糖 및 脂質成分

(1) 糖成分 分析

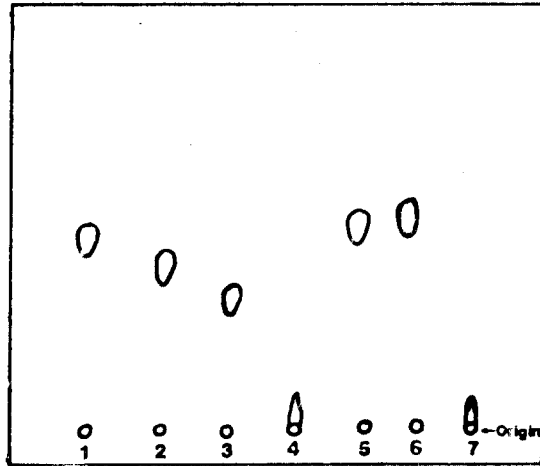


Fig. 8. Separation of sugars of *Antheraea yamamai* vitellin on buffered kieselguhr G layers.

1, fructose; 2, glucose; 3, saccharose; 4, vitellin of *A. yamamai*; 5, mannose; 6, arabinose; 7, raffinose.

Solvent mixture, *n*-butanol; acetone; phosphate buffer. (40 : 50 : 10. V/V/V).

Detection, orcinol-sulfuric acid.

天然 vitellin에서는 한종류의 糖만이 검출되었고 移動度는 raffinose와, 그리고 發色程度는 mannose와 같으므로서 정확한 동정이 곤란하였다(그림 8).

그러나 家蠶(Izumi 등, 1980b), Eri-蠶(Chino 등, 1977) 및 풀무치 등의 vitellin에서 mannose가 검출된 점을 고려하면 이러한 점으로 미루어 보아 天蠶 vitellin의 糖成分도 電氣泳動후 gel에서 vitellin을 용출시킬 때 사용한 0.04M tris-0.38M glycine 완충액(pH 8.3)

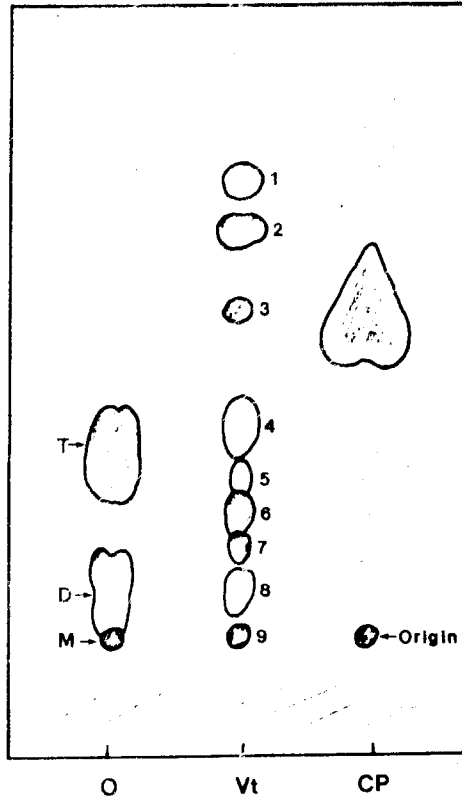


Fig. 9. Separation of neutral lipids of *Antheraea yamamai* vitellin on silica gel. O, olein; Vt, vitellin of *A. yamamai*; CP, cholesteryl palmitate; M, monoolein; D, diolein; T, triolein. Mobile phase, petroleum ether; diethyl ether; acetic acid(90 : 10 : 1, V/V/V). Detection, chromic acid; sulfuric acid(1 : 1, V/V)

의 영향에 의해 移動上의 장애를 받은 mannose일 가능성이 높지만 이전에 대하여는 금후 보다 상세히 연구되어야 할 것으로 생각한다.

(2) 脂質成分 分析

天蠶의 脂質은 그 種類가 상당히 多樣하게 분리되었는데(그림 9), 1번은 移動도가 가장 빠른 것으로 미루어 炭化水素類로 추정되며 3번은 cholesteryl palmitate와 移動도는 비슷하나 發色程度가 낮은 것으로 미루어 飽和脂肪으로 推定되며 5, 6, 7번은 發色은 되었으나 어떤 脂質인지는 알 수 없었다. 9번 역시 monoolein인지의 여부는 현재로서는 不明하다.

家蠶의 경우에 麟脂質이 顯격히 많고, diacylglycerol이 나오이며 triacylglycerol과 cholesterol도 검출되

었으나 monoacylglycerol은 검출되지 않았다(Izumi 등, 1980b).

Eri-蠶의 경우도 家蠶과 같은 경향이었으나 麟脂質 함량이 家蠶의 1/10도 안되었었다(Chino 등, 1969).

天蠶의 경우 역시 금후 發色試藥이나 展開溶媒, 標準試藥 등을 다양하게 試驗하여 家蠶이나 Eri-蠶에서 검출된 麟脂質과 그 종류에 대한 분석이 심도있게 추구 되어야 할 과제이다.

3. 아미노酸 分析

天蠶의 天然 vitellin의 아미노酸 組成을 알기 위해 精製 vitellin을 6N-HCl로 25시간 加水分解한 뒤 종류수로 세척하여 아미노酸 自動分析機(Hitachi 835)로 分析한 結果는 表 1과 같다.

天蠶 vitellin중에는 glycine이 가장 많고 glutamic acid, aspartic acid, lysine의 순이었고 cystine이 가장 적었다.

家蠶의 경우 glutamic acid와 aspartic acid가 顯격

Table 1. Amino acid composition of the vitellin of *antheraea yamamai*.

| Amino acid | % | Amino acid | % |
|---------------|------|---------------|-----|
| Cystine | 0.7 | Alanine | 4.3 |
| Methionine | 3.7 | Valine | 4.3 |
| Aspartic acid | 9.2 | iso-Leucine | 4.4 |
| Threonine | 4.0 | Leucine | 6.3 |
| Serine | 5.1 | Tyrosine | 3.9 |
| Glutamic acid | 12.8 | Phenylalanine | 3.5 |
| Proline | 3.2 | Lysine | 7.2 |
| Glycine | 18.3 | Histidine | 4.7 |
| | | Arginine | 4.4 |

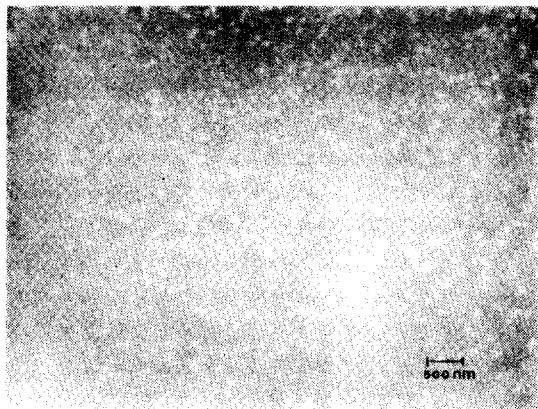


Fig. 10. Electron micrograph of the purified vitellin of *Antheraea yamamai*. The sample was negatively stained with 2% phosphotungstic acid.

히 많고 methionine과 histidine이 적으며(Izumi와 Tomino, 1983), Eri-蠶의 경우도 家蠶과 거의 같은 경향이였다(Chino 등, 1976). 그의 다른 昆蟲의 아미노酸 分析結果를 보면 昆蟲에 따라 그 組成에 차가 많았으나 대체로 家蠶과 같은 경향이였다.

4. 電子顯微鏡的 解察

그림 10에서 보는 바와 같이, 分離·精製된 vitellin은 불순물이 거의 없고 純度가 높았다.

天蠶 vitellin粒子는 대체로 均一한 球形이었으며 크기는 $14 \pm 0.8 \text{nm}$ 로 家蠶의 그것보다 약간 큰 것으로 판명되었다.

摘 要

分離·精製한 天蠶 vitellin의 分子量推定, 糖 및 脂質成分의 存在有無, 電子顯微鏡의 形態 및 크기, 아미노酸 組成, 耐熱性 등 여러가지 特性을 調査하였다.

1. 分離·精製된 天蠶의 vitellin은 電氣泳動像의 移動도가 다른 large 및 small subunit로 되어 있다.

2. 天蠶 vitellin의 分子量은 약 450,000로 추정되었고, large subunit와 small subunit는 각각 174,000와 44,000로 추정 되었다.

3. Coomassie brilliant blue, sudan black B 및 PAS 염색에 의해서 天蠶의 vitellin은 glycolipoprotein으로 동정 되었으며, 2개의 subunit도 糖과 脂質成分을 가지고 있었다.

4. 天蠶 vitellin의 脂質成分중에는 家蠶이나 Eri-蠶에 비하여 매우 다양한 종류들이 검출되며 특히 飽和脂肪이라고 추정되는 물질도 있었다.

5. 天蠶 vitellin의 蛋白質과 糖成分은 70°C 에 60분까지는 안정성을 보였으나, 같은 조건에서 脂質成分은 검출되지 않았다.

6. 天蠶 vitellin의 아미노酸 成分중 다른 昆蟲에서는 함량이 적은 glycine이 현저히 많았고 기타 성분은 함량은 家蠶이나 Eri-蠶과 같은 경향이였다.

7. 天蠶의 vitellin은 直徑이 $14 \pm 0.8 \text{nm}$ 의 均一한 球形이었다.

引 用 文 獻

1. Chen, T.T., Strahlendorf, P.W. and Wyatt, G.R. (1978) Vitellin and vitellogenin from Locusts (*Locusta migratoria*). Properties and post-translational modification in the fat body. J. Biol. Chem. 253:5325-5331.

2. 芽野春雄. (1987) 리보호린ル昆蟲·蛋白質·核酸·酵素. 32(12):1413-1420.

3. Chino, H., Murakami, S. and Harashima, K. (1969) Diglyceridecarrying lipoprotein in insect hemolymph. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta 176:1-26.

4. Chino, H., Yamagata, M. and Sato, S. (1977) Further characterization of Lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. Insect Biochem. 7:125-131.

5. Chino, H. Yamagata, M. and Takahashi, K. (1976) Isolation and characterization of insect vitellogenin, its identity with hemolymph lipoprotein II. Biochim. Biophys. Acta 441:349-353.

6. Chinzei, Y., Chino, H. and Wyatt, G.R. (1981) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. Insect Biochem. 11:1-7.

7. Gamo, T. (1978) Low molecular weight lipoproteins in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.: Inheritance, isolation and some properties. Insect Biochem. 8:457-470.

8. Glossmann, H. and Neville, Jr. D.M. (1971) Glycoproteins of cell surfaces. J. Biol. Chem. 246:6339-6346.

9. Hagedorn, H.H. and Kunkel, J.G. (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. Annu. Rev. Entomol. 24:475-505.

10. Harnish, D.G. and White, B.N. (1982) Insect vitellins: Identification purification, and characterization from eight orders. J. Exp. Zool. 220: 1-10.

11. Hedrick, J.I. and Smith, A.J. (1968) Size and Charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophysics 126: 155-164.

12. 井口民夫, 中井正憲. 1978. 家蠶의 비테로즈엔인에關する研究 1. 同定とアミノ酸組成, 蠶試報 27: 579-593.

13. 泉進·富野士良 1976. 昆蟲變態時の蛋白質代謝 1. (要旨). 動雜. 85:406.

14. 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.
15. Izumi, S. and Tomino, S. (1983) Vitellogenin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*: Separate mRNAs encode two subunits of vitellogenin. *Insect Biochem.* 13:81-85.
 16. Izumi, S., Tonino, S. and Chino, H. (1980b) Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10:199-208.
 17. Koeppe, J. and Offengand, J. (1975) Juvenile hormone-induced biosynthesis of vitellogenin in *Leucophaea mederae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 173:100-113.
 18. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.
 19. Mine, E., Izumi, S., Katsuki, M. and Tomino, S. (1983) Development and sex-dependent regulation of storage protein synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Biol.* 97:329-337.
 20. Ogawa, K. and Tojo, S. (1981) Quantitative changes of storage proteins and vitellogenin during the pupal-adult development in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 16:288-296.
 21. Swahn, B. (1953) Studies on blood lipids. *Scand. J. Clin & Lab. Invest. suppl.* 9.
 22. Tojo, S., Nagata, M. and Kobayashi, M. (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10:289-303.
 23. Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulphat-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412.
 24. Zacharius, R.M., Zell, I.L., Morrison, J.H. and Woodlock, J.J. (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 30:148-152.