

# 한국산 멧누에 (*Bombyx mandarina*)에 있어서 난각유전자의 형질발현 I. 난각구조의 특이성과 Chorion 단백질

## Chorion Gene Expression in the Cellular Differentiation and Accumulation of Chorion Protein of Silkmoth, *Bombyx mandarina* I. Specific Structures of Egg-shell and Chorion Protein

盧時甲<sup>1</sup>

Si Kab Nho

**ABSTRACT** The surface patterns and the structures of transverse section of the egg-shell of the silkmoth, *Bombyx mandarina*, have been described by scanning electron microscope. Three spatially differentiated cross section, called lamellar, conic pillar and cover layers, are found on the mature egg-shell. Silkmoth chorion proteins were detected more than 80 components from a single chorion by two-dimensional electrophoresis. Major protein components of the egg-shell have been identified on the basis of their isoelectric points and molecular weights, pI 4-6 and 6-30 kd. Several protein components are found entirely or predominantly in the cover layer.

**KEY WORDS** *Bombyx mandarina*, chorion gene, scanning electromicroscope, two-dimensional gel electrophoresis, tissue specific proteins

**초 록** 한국산 멧누에(*Bombyx mandarina*)chorion 유전자의 형질 발현기구를 규명하기 위한 연구의 일환으로 본 실험을 실시했다. 멧누에의 난각구조를 주사형 전자현미경에 의해 관찰한 결과 매우 특이적인 구조가 인정되었다. 즉 원추상의 불규칙 돌기에 의한 돌기구조층과 이 돌기 구조층을 덮고 있는 한 층의 얇은 덮개 구조층이 그것이다. 2차원 전기영동법에 의해 chorion 단백질을 분석한 결과, 난각을 구성하는 주요 단백질 성분은 등電点 4~6, 분자량 6~30 kd로 밝혀졌다. 특히 특이난각구조와 관련된 특이단백질 성분을 검출하였으며 이들의 대부분은 高cysteine 단백질인 것으로 추정했다. 이상의 연구결과에 의해 멧누에 난각의 특이 구조 형성에 따른 유전자발현기구 규명을 위한 기초자료가 얻어졌다.

**검색어** 멧누에, chorion 유전자, 주사형 전자현미경, 2차원 전기영동, 조직특이 단백질

누에나방과(Bombycidae)에 속하는 멧누에(*Bombyx mandarina*)는 뽕나무잎을 먹고사는 絹絲蟲類의 일종이며 집누에(*Bombyx mori*)의 유일한 선조형으로 추정되고 있다(Murakami 1974).

이 멧누에와 집누에와의 관계를 규명하기 위한 일련의 유전학적 연구가 주로 생화학적 방법에서 행해졌다(Yoshitake 1966). 즉

어느 특정 유전자를 지표로 하여 멧누에와 집누에가 어떠한 변이과정을 밟았으며 생물군내에서 어떻게 진화되었는가에 대한 것이 그것이다.

난형성의 최종단계인 난각(chorion)형성과정은 包卵皮膜細胞로부터 분비된 난각형성물질(chorion protein)이 난표면에 집적되고 일정형태로 구축되며 이것에 의해 특유의 卵形과 난

1 경북대학교 농과대학(College of Agriculture, Kyungpook National University)

각구조가 형성되는 과정을 의미한다 (Sander et al. 1985). Chorion 단백질의 합성과 분비 및 구축은 일정한 process에 의해 일어나는데 이 과정에서 수종의 유전자들이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Regier & Kafatos 1985). 최근 집누에의 chorion gene이 cloning되어 유전자의 구조는 물론 조절기구까지도 밝혀지고 있으나 (Eickbush & Kafatos 1982, Eickbush et al. 1985) 근연곤충인 멧누에에 대해서는 거의 밝혀져 있지 않다. 이와같은 관점에서 볼 때 chorion 유전자는 생물체의 변이와 진화과정을 연구하는데 매우 유용한 지표로 쓰일 수 있다.

본 연구는 멧누에의 난형성과정중 chorion gene의 형질발현기구를 규명하는 것을 최종목표로 하고 있으며 그의 일환으로 멧누에 卵의性状과 난각의 미세구조 및 구조의 특이성 등을 주사형 전자현미경 수준에서 밝힘과 동시에 고분리능의 전기영동법을 이용하여 난각구성 단백질의 분석을 시도하였다. 또한 특이난각구조의 형성과 관련된 특이단백질의 검출을 시도하였다.

### 재료 및 방법

실험에 사용한 재료는 일반桑田에서 채집한 야생 멧누에의 난소卵을 사용했다. 멧누에는 경상북도 북부지방과 남부지방에서 각각 채집했으며 유충일 경우에는 27°C 내외의 사육실에서 사육하였고 化蛾된 나방으로부터 완성卵만을 채취했다.

#### 난의 형태 및 난각구조의 관찰

멧누에의 암나방을 0.75% 생리식염수중에서 해부한 후 난관의 기부로부터 완성란만을 채취했다. 이 卵을 증류수로 2~3회 씻은 후 여과지 위에서 건조하였다.

電顯觀察用 난은 -20°C carnoy액에 24시간 고정하여 alcohol 係에서 탈수한 후 Hitachi HCP-2 臨界点乾燥裝置에서 건조했다.

난의 표면 및 단면 관찰은 ion coater에 의해 carbon coating시킨 후 Akashi ISI-SS130 주사형 전자현미경으로 가속전압 15~20 KV, 50~

7000倍로 行했다.

난각 두께의 측정은 다음과 같이 했다. 해부용 칼로 試料卵을 난의 표면과 직각이 되도록 자른 후 난 내용물을 완전히 제거했다. 자른 난각면과 시료대의 면이 평행이 되도록 양면 tape로 고정하여 走査電顯으로 촬영한 후 확대배율에 따라 실제의 두께로 환산했다.

#### 난각단백질(chorion 단백질)의 분석

멧누에나방의 난관으로부터 완성란을 채취하여 卵黃을 비롯한 난내용물을 증류수로 2~3회 세척한 후 전기영동용 시료란으로 사용했다. 6 M Urea, 0.05 M Tris-HCl(pH 9.0), 0.01 M Lysine, 0.07 M DTT의 lysate buffer를 사용하여 실온에서 2시간정도 용해시켰다. 이 시료액에 1/2 volume의 0.42 M iodoacetamide를 첨가한 후 30분간 차광상태에서 반응시켰다. 여기에 2-Mercaptoethanol를 최종농도 3%가 되도록 첨가한 후 전기영동용 시료로 사용했다.

전기영동은 2차원 전기영동법(Goldsmith et al. 1980, Nadel et al. 1980)을 사용했다. 즉 2% carrier ampholine(LKB, 4-6)을 함유한 5% acrylamide를 지지체로 한 등전점 전기영동용 1차원 전기영동으로, 6.5 M Urea, 0.5% SDS를 함유한 10% acrylamide에 의한 SDS-PAGE를 2차원 전기영동으로 하였다. 등전점 전기영동 후 2차원 전기영동용 gel은 -20°C의 냉동고에 보관하였다가 사용하였고 나머지 gel은 10% TCA에 고정한 후 0.01% CBB(G250)로 염색했다.

2차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법에 준했으며 영동이 끝난 gel을 20% TCA에 고정하여 0.1% CBB로 염색했으며 7.5% acetic acid, 5% methanol용액으로 탈색했다.

### 결 과

#### 난의 외부형태와 표면구조

멧누에란의 주사형 전자현미경 관찰상을 Fig. 1에 나타냈다. 사진에서 (Fig. 1A)보는 바와같이 난은 양면이 편평한 타원형을 이루고

있으며 크기는 장경이  $1.2 \pm 0.5 \text{ mm}$ , 단경이  $0.9 \pm 0.3 \text{ mm}$ 이었다. 난의 표면구조는 편평한 측면부와 그 주변부가 서로 相異한데 측면중앙부의 경우 뚜렷한 표면구조가 관찰되나 주변부에는 이와같은 뚜렷한 구조를 인정할 수 없었다.

Fig. 1B에 精孔部の 관찰상을 나타냈다. 정공부에서는 2~3개의 精孔副枝가 형성된 정공을 중심으로 7~10개의 국화꽃잎모양의 斑紋 즉 花弁狀構造가 관찰되었다. 이 화변상구조는 정공을 접하고 있는 1열째와 이를 싸고있는 2열째 구조로 나눌 수 있는데 1열째와 2열째의 사이에는 뚜렷한 구조적인 차이점이 있었다. 또한 2열째의 화변상구조와 그 주변부와의 사이에는 화변의 외측부를 따라 깊게 함입된 홈이 관찰되었다.

Fig. 1A의 난 측면 중앙부분을 Fig. 1C에 확대하였다. 화살표(Fig. 1C)부분이 小塊狀의 구조로 난표면으로부터 융기되어있다. 이들 융기된 소피부분을 선으로 연결하면 5~6각형의 모양이 되는데 이것으로 포란피막세포의 모양과 크기를 알 수 있다. 또한 이 소피는 3개의 포란피막세포가 만나는 지점에 반드시 형성된다.

이와같은 구조는 난의 양측면부에서만 관찰되었으며 他부위에서는 인정할 수 없었다.

또한 난의 표면에서는 氣孔開口部를 관찰할 수 없었다.

Fig. 2A와 2B에 멧누에란의 복면부와 측면부의 난각단면 구조상을 나타냈다.

사진에서 보는 바와 같이 멧누에의 난각단면은 매우 특이한 구조를 나타냈다. 즉 난의 내부와 가까운 쪽으로부터 A, B, C의 3개의 층으로 구분할 수 있는데, A층은 lamella상 구조물이 균일하게 층상으로 집적되어 형성된 소위 파상구조 혹은 층상구조를 나타냈다. A층의 두께는 측면부가  $20 \sim 25 \mu\text{m}$ , 복면부가  $13 \sim 20 \mu\text{m}$ 이었다.

A층에 이어 B층에는 크기가 서로 다른 원추형돌기가 형성되어 있다. 이 돌기구조의 하부는 A층과 동일한 lamella 구조를 이루고 있으나 상부에서는 관찰이 곤란했다.

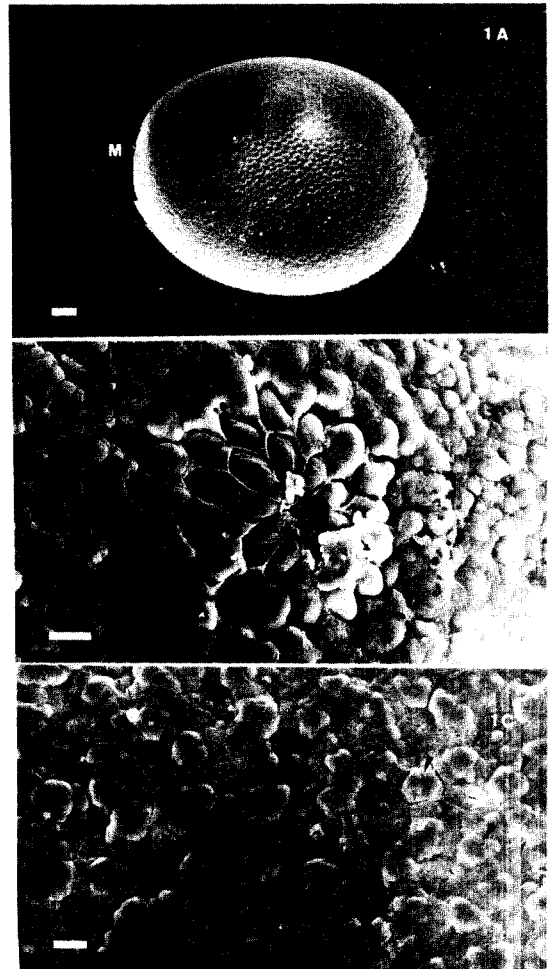
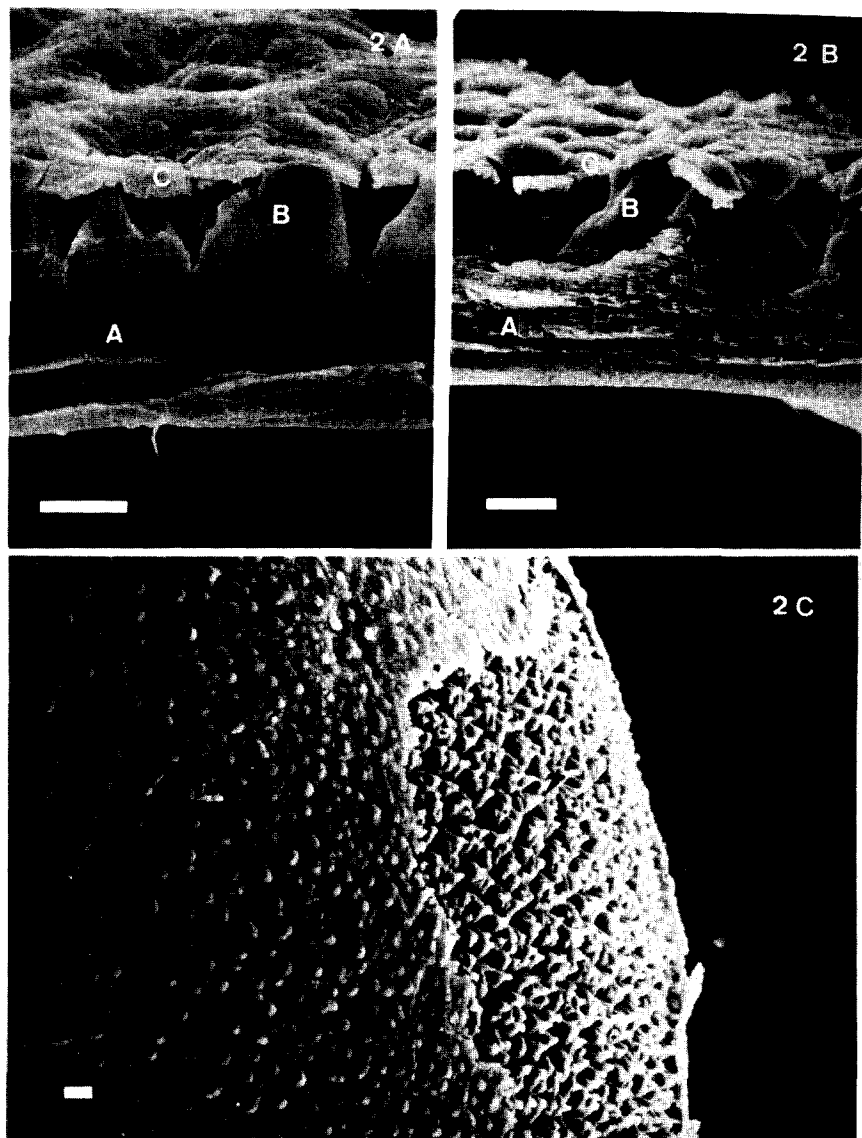


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the outer surface of a mature egg-shell of *Bombyx mandarina*. 1A, whole view (M indicates micropyle); 1B, micropyle region; 1C, lateral (flat)region. 1A scale bar =  $100 \mu\text{m}$ , 1B & 1C scale bar =  $10 \mu\text{m}$ .

이 원추상 돌기의 높이를 보면 배면 및 복면부가  $7.64 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , 측면부가  $13.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 로 부위에 따라 다르게 나타났다.

난각의 최외층부인 C층은 두께  $2 \sim 3 \mu\text{m}$ 로써 부위에 따른 차이는 인정할 수 없었다. 이 층은 B의 돌기구조층의 상부를 덮어싸고 있는 구조물로서 A, B층에서 보이는 층상구조는 인정할 수 없었다. 이 덮개층구조는 난각으로부터 쉽게 분리되며 해부현미경 하에서도 식별이



**Fig. 2.** Scanning electron micrographs of chorions vertically ripped at lateral region and outer surface of mature eggs of *B. mandarina*. 2A, vertically section by the steel razor; 2B, vertically ripped section by the hand; 2C, outer surface of mature egg-shell from which a part of cover layer have been removed by dissection (arrow indicates protuberances). Scale bar = 10 $\mu$ m.

가능했다. 실제로 C층을 제거할 경우 Fig. 2C와 같은 원추상 돌기 (화살표) 구조를 관찰할 수 있다.

한편 난각의 부위별 두께는 측면부가  $29.0 \pm 1.8\mu\text{m}$ , 배면 및 복면부가  $21.4 \pm 4.3\mu\text{m}$ 이었으며 채집지역에 따른 난각구조상의 변이나 차

이는 인정할 수 없었다.

#### Chorion 단백질의 분석과 난각구조의 특이성과의 관계

맷누에 난각단백질의 2차원 전기영동상을 Fig. 3B에 나타냈다. 이들 chorion 단백질은 20여개의 주요성분과 50여개의 미량성분으로 분

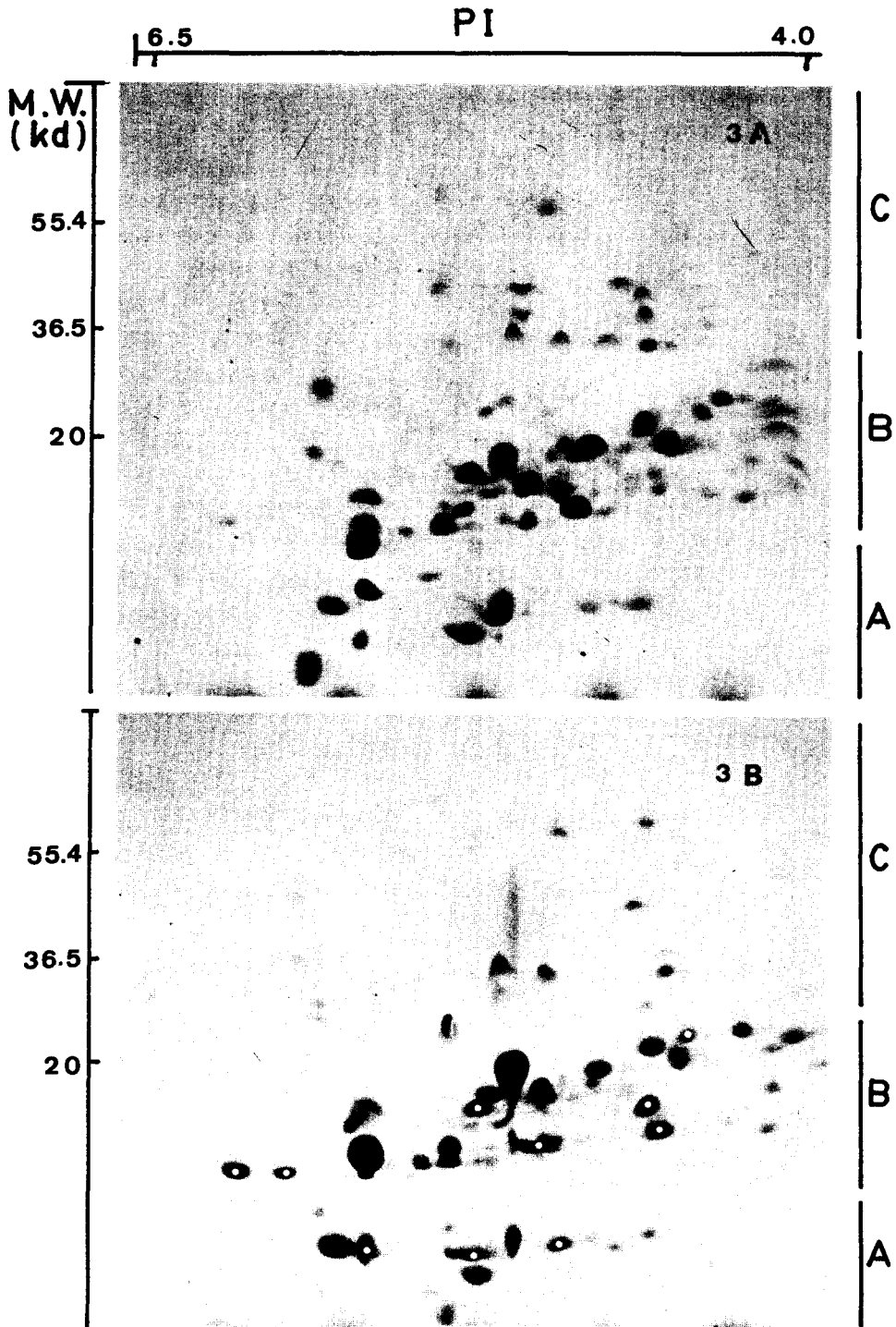


Fig. 3. Protein patterns of mature egg-shell by two dimensional gel electrophoresis. (See Material and Method) 3A, *Bombyx mori* chorion; 3B, *B. mandarina* chorion.

리되었으며 등전점 4.0~6.5, 분자량 6,000~75,000에 대부분의 성분이 검출되었다. 검출된 단백질성분을 분자량에 따라 대략적으로 3부분으로 구분할 수 있었다. 즉 분자량 10kd 미만의 A group, 10~24 kd의 B group과 24 kd 이상의 C group이 그것이다.

A group에는 6개의 주요성분과 10여개의 미량성분이, B group에는 16개의 주요성분과 20여개의 미량성분이, C group에는 대부분이 미량성분으로 구성되어 있었다.

Fig. 3A에 집누에의 난각을 동일한 조건으로 분석한 결과를 나타냈다.

멧누에의 chorion 단백질을 집누에의 그것과 비교하여 볼 때 전기영동에 의한 단백질의 분리 pattern, 각 성분들의 분자량, 등전점, 크기 및 성분수 등이 매우 유사했다. 그러나 group A와 B의 주요성분 중에서도 등전점과 분자량이 근소하게 다른 수개의 성분이 멧누에에서 인정되었으며 특히 Fig. 3B의 흰점으로 표시된 주요성분들은 멧누에의 난각단백질에서 만이 특이적으로 검출되었다. 또한 C group의 성분들에 있어서는 집누에의 그것들과 매우 상이한 것으로 나타났다.

Fig. 2에서 관찰한 것과 같이 멧누에의 난각은 매우 특이한 구조를 나타냈다. 특히 Fig. 2C의 화살표 부분을 보면 덮개층이 분리되어 원추상 돌기로 된 층만이 노출되어 있다. 또한 이 덮개층은 쉽게 분리할 수 있어서 이 부분만을 분석할 수가 있었다. 따라서 멧누에 난각의 구조적인 특징과 난각구성 단백질과의 관계를 밝히기 위한 1차적인 실험으로 난각으로부터 덮개층 부분만을 분리 채취하여 분석을 실시하였다.

Fig. 4A, 4B, 4C에 이들 단백질의 등전점 전기영동상을 나타냈다. Fig. 4A는 소난각단백질을, Fig. 4B는 덮개층 부분을 제외한 나머지 부분을, Fig. 4C는 덮개층 부분만을 분석한 결과이다. Fig. 4C는 덮개층 부분만을 분석한 결과이다. Fig. 4C에 나타난 바와 같이 덮개층 부분을 구성하는 단백질 band는 7개의 주요성분으로 나타났다. 특히 band 5, 7을 제외한 나머지 1, 2, 3, 4, 6의 성분은 덮개층부분에서만 특이

적으로 검출되었다.

## 고 찰

한국산 멧누에에 있어서 난각유전자의 형질 발현기구를 규명하기 위한 연구의 일환으로 멧누에 난에 대한 기초적인 연구를 실시하였다.

멧누에의 난은 장경 1.2 mm, 단경 0.9 mm 내외의 양측면부가 편평한 장타원형으로 난의 크기나 외부형태에 있어서 집누에난과 매우 유사했다. 표면구조에 있어서도 난의 측면중앙부에 있어서는 포란피막세포의 刻印상태가 매우 뚜렷하여 포란세포의 형태나 크기를 알 수 있었다. 이와같은 사실은 포란피막세포의 부위특이적인 난각구축기능에 의한 것으로 생각되며 편평타원형의 卵形형성과도 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다.

한편 난각의 두께를 보면 평균 25  $\mu$ m정도로서 집누에의 난각보다 훨씬 두꺼운 것으로 나타났다. 또한 난의 부위에 따라서도 측면부가 배면 및 복면부에 비해서 두꺼운데 이와같은 사실은 집누에의 경우와 매우 유사했다(盧 1988).

난각 단면구조(Fig. 2)의 관찰에 의해 멧누에 난각의 매우 특이적인 난각구조가 밝혀졌다. A층의 구조는 집누에의 중층부구조와 동일한 lamella 구조를 형성하지만 외층부에 해당하는 부위에 있어서는 매우 특이한 구조가 관찰되었다. 즉 원추상의 불규칙한 돌기에 의해 형성된 돌기구조가 그것이다(Fig. 2A, 2B). 走査型電顯의 관찰에 의해 돌기의 내부구조는 층부의 lamellae 구조와 동일한 것으로 나타났다.

이 사실은 chorion 단백질의 집적과정인 A층부와 돌기층부가 동일하다는 것을 의미한다. 따라서 돌기구조는 chorion 단백질의 집적과정과 형태구축과정에서 특이적인 형성과정을 밟은 결과라고 추정된다.

한편 돌기구조의 외층부에서는 한 층의 얇은 구조물에 의해 싸여있는 덮개구조층이 관찰되었다. 이 구조층에 있어서는 lamellae 구조를 인정할 수 없을 뿐만아니라 타부위의 구조와도 매우 상이했다. 따라서 이 덮개구조층은 멧누

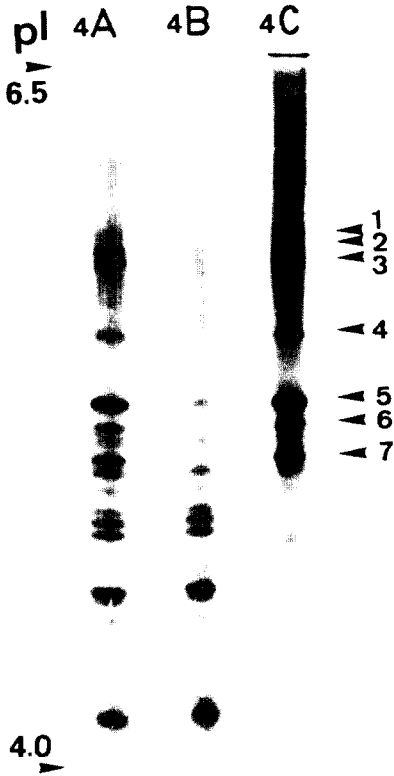


Fig. 4. The chorion proteins of cover layer are identified by isoelectric focusing. Chorion proteins from entire egg-shell (4A), except the cover layer (4B) and cover layer only(4C). The numbers on the 4C gel indicates some of the major chorion protein of cover layer.

에 난각의 가장 뚜렷한 특징중의 하나이며 돌기구조층과 함께 매우 특이적인 卵殼構造를 나타낸다.

또한 덮개층의 외부에는 氣孔開口部를 관찰할 수 없었으나 이 구조층의 조직이 치밀하지 못한 것으로 미루워 볼 때 난의 傘域으로부터 gas 교환이 가능할 것으로 생각된다.

멧누에의 chorion 단백질을 2차원 전기영동법에 의해 분석한 결과(Fig. 3B) 약 70~80개의 단백질성분이 검출되었다. A 및 B group의 성분들이 chorion 단백질의 대부분을 차지하며 특히 이중에서도 major spot들은 난각을 구성하는 주요 구조단백질인 것으로 생각된다. 집누에의 A, B group(Fig. 3A)과 비교할 때 주

요성분들의 전기영동 pattern이 유사하며 성분수에 있어서도 비슷했다. 그러나 C group의 성분들에 있어서는 집누에와 멧누에 간에 매우 상이한 것으로 나타났다.

C group의 대부분이 high-cysteine 단백질(M. R. Goldsmith 私信)인 것을 감안할 때 집누에와 멧누에 사이의 차이는 매우 흥미로운 사실이다. 특히 Fig. 4의 결과를 종합하여 볼 때 C group의 대부분은(Fig. 3B)멧누에의 덮개층구조에서 유래된 것이 틀림없으며 이들 단백질은 대부분이 high-cysteine단백질인 것으로 추정된다.

Fig. 2에서 보는 바와같이 멧누에의 난각은 매우 특이한 구조를 나타낸다. 즉 덮개구조층과 돌기구조층이 그것이다. 특히 덮개구조층의 경우 조직의 성질이 他구조층과는 매우 다르며 또한 일반 해부현미경하에서도 분리가 용이했다. 이와같은 특이구조의 형성은 chorion 단백질의 합성, 분비 및 구축과정에서 어떤 특징의 유전자군 혹은 유전자의 작용에 의한 것이라고 생각할 수 있다. 이에 특이구조와 관련된 chorion 단백질의 검출을 시도했다. 덮개구조층 부분만을 분리 채취하여 전기영동을 한 결과(Fig. 4C) 등전점 4~5 분자량 36 kd~60 kd부분에서 대부분의 성분이 검출되었다. 이와같은 사실은 덮개층을 형성하는 chorion 단백질은 타부위를 형성하는 단백질과는 상이하다는 것을 의미하며 특이난각구조는 이와 관련된 특이 단백질의 분비와 구축에 의해서 일어난다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 한국산 멧누에의 난은 매우 특이한 난각구조를 나타내며 이같은 특이난각구조는 야생곤충의 종족유지 본능에서 볼 때 매우 유리한 조건으로 생각된다. 또한 특이난각구조를 형성하는 과정에서 특징의 chorion 단백질이 조직특이적으로 분비 구축되고 있다는 사실이 밝혀짐과 동시에 세포분화에 따른 특정유전자의 작용 가능성을 강력히 시사하는 것으로 생각된다. 따라서 이들 특이단백질의 합성 및 분비과정과 이에 따른 유전자의 조절기구에 대한 연구가 필요하며 나아가서는 이들 특이유전자의 검출과 유전자 자체에 대한

분자유전학적인 측면에서의 연구도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

### 사 사

본 연구는 학술진흥재단의 학술연구조성비에 의하여 수행되었음.

### 인 용 문 헌

- Eickbush, T. H. & F. C. Kafatos. 1982. A walk in the chorion locus of *Bombyx mori*. *Cell* 29: 633~643.
- Eickbush, T. H., G. C. Rodakis., R. Lecanidon & F. C. Kafatos. 1985. A complex set of early chorion DNA sequences from *Bombyx mori*. *Dev. Biol.* 112: 368~376
- Goldsmith, M. R., E. C. Rattner, M. D Koehler, S. R. Balikov & S. C. Bock. 1979. Two dimensional electrophoresis of small molecular weight proteins. *Anal. Bioch.* 99: 33~40
- Murakami, A. & H. Imai. 1974. Cytological evidence for holocentric chromosomes of silkworm, *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*. *Chromosoma* 47: 167~178.
- Nadel, M. R. & F. C. Kafatos. 1980. Specific protein synthesis in cellular differentiation. (4) The chorion proteins of *Bombyx mori* and their program of synthesis. *Dev. Biol.* 75, 26~40.
- 盧時甲. 1988. 腎臟形卵에 있어서 난각구조의 해석. *韓蠶學誌* 30: 88~95.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007~4021.
- Regier, J. C. & F. C. Kafatos. 1985. Molecular aspects of chorion formation in "Comprehensive Insect Physiol. Biochem. and Pharmacology". Vol. 1: 113~151.
- Sander, K. H. , O. Gutzeit & H. Jackle. 1985. Insect embryogenesis, morphology, physiology, genetical and molecular aspects. in "Comprehensive Insect Physiol. Biochem. and Pharmacology" Vol. 1: 321~385.
- Yoshitake, N. 1966. Esterase and phosphatase polymorphism in natural population of wild silkworm, *Bombyx mandarina*. *Jpn. J. Seri.* 37: 195~200.

(1990년 1월 22일 접수)