

## 누에알의 배자발육에 따른 可溶性 및 不溶性 단백질의 변화

成 洙 一

水原大學校 理科大學

### Change in Soluble and Insoluble Proteins during Embryonic Development of the Silkworm, *Bombyx mori*

Su Il Seong

College of Natural Science, The University of Suwon

#### Summary

PBS soluble and insoluble-extracts from silkworm eggs were analysed by native-PAGE and SDS-PAGE. During the embryonic development, soluble proteins which are mainly composed of ESP, vitellin and 30K proteins showed similar degradation pattern in both electrophoretic analyses. Several peptides which seemed to be intermediated forms of yolk proteins were detected in latter part of embryogenesis, while a protein band newly appeared in one day elapsed after acid treatment.

When insoluble extracts from silkworm eggs were analysed with SDS-PAGE, several peptides were detected at the later stages of the embryonic development, and newly hatched larvae. These peptides are considered to be structure proteins for embryonic morphogenesis.

#### 緒 論

곤충알의 배자 발육에 따른 단백질대사는 주로 단백질합성(Roberts and Graziosi, 1977; Tilden and Ferkovich, 1987; 河口·藤井, 1984)과 난황단백질의 분해 및 배자발육에의 이용(McGregor and Loughton, 1974; Bownes and Hames, 1977; Storella *et al.*, 1985; Zhu *et al.*, 1986)의 관점에서 연구가 되어져 왔다.

河口·藤井(1984)는 누에알에 방사성 아미노산과 actinomycin D를 투여하여 RNA 합성계를 制御하고 이에 따른 단백질 합성을 조사한 결과, 발생초기는 母性 mRNA에, 그리고 발생 중기이후는 시기 특이적 유전자의 활성화에 따른 배자 유래의 mRNA에 각각 의존하여 단백질의 합성이 이루어지고 있음을 발견하였다.

한편 누에알의 난황단백질은 그의 90% 이상이 vi-

tellin과 egg specific protein(ESP) 및 30K 단백질로 구성되어 있으며 이들 단백질들은 배자 발육 기간 중 단백질의 분해시기 및 분해과정 등에 차이를 나타내므로써 배자발육에 관여하는 각 난황단백질들의 역할이 각각 다름을 말해주고 있다(Irie and Yamashita, 1980, 1983; Zhu *et al.*, 1986; Indrasith *et al.*, 1987).

이상의 누에 배자발육에 대한 단백질 대사에 관한 연구는 주로 누에알로부터의 可溶性 추출물을 대상으로 한 것이고 알 마쇄액으로부터 원심 상층액(가용성 성분)을 분리시킨 원심 침전물(不溶性 성분)에 대한 단백질 조사는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는, 배자 발생 중의 누에알로부터 經時的으로 가용성 분획과 불용성 분획을 추출한 후 이들에 대한 SDS-PAGE 분석을 하여 배자의 형태형성과 함께 나타나는 peptides의 변화를 구조단백질의 생성과 관련하여 고찰하였다.

## 材料 및 方法

### 1) 누에알

실험재료는 누에품종 백옥잠(잠123×잠124)의 알을 사용하였다. 알의 채취는 교미를 끝낸 일정수의 암나방을 산란종이에 놓고 일정시간까지 낳은 알만을 혼합하므로써 卵齡을 고르게 하였다. 산란 후 20시간째 염산처리(염산비중 1.075, 액은 46°C, 5분)하고 이후 배자발육의 전 기간을 25°C에서 보호하였다. 침산후 10일째 개미누에가 깨어나왔다.

### 2) 단백질 추출

발육단계별 누에알 또는 개미누에 100 mg에 차가운 인산완충생리식염수(PBS, pH 6.8)를 0.5 ml/넣은 후 glass homogenizer로 충분히 마쇄하였다. 마쇄액은 10,000g에서 20분간 저온(4°C) 원심분리하여 그의 상층액을 가용성 단백질 시료로 하였다.

침전물이 들어 있는 원심관에는 2 ml의 PBS액을 넣어 침전물과 PBS액을 잘 혼합한 후 원심분리를 하여 상층액을 제거하였다. 이와같은 조작을 3회 반복하여 원심침전물을 충분히 洗淨하고 마지막 원심후 얻어진 침전물을 불용성 단백질의 시료로 하였다.

### 3) 전기영동

Native 단백질에 대한 전기영동(native-PAGE)은 前報(1984)에 따라 7.5%의 polyacrylamide gel에 의한 slab 전기영동을 하였다. 이 때 각 試料溝에는 10  $\mu$ l의 단백질 추출액을 넣었다.

SDS-전기영동(SDS-PAGE)을 위한 시료의 SDS 처리는 우선 가용성 단백질의 경우 단백질 추출물을 최종농도 1% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 6.8) 및 20% glycerol의 혼합액을 만들고 100°C에서 5분간 가열한 후 10,000g에서 5분간 원심한 상층액을 泳動用 시료로 하였다. 원심침전물의 경우는 역시 1% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 6.8) 및 20% glycerol 혼합액을 침전물 重量의 10배량을 넣고 100°C에서 5분간 가열한 후 10,000g에서 5분간 원심한 상층액을 전기영동의 시료로 하였다.

SDS-PAGE는 前報(1986)에 따라 10% SDS-polyacrylamide gel에 의한 slab 전기영동을 하였다. 단백질의 분자량은 같은 조건에서 전기영동한 marker proteins(Sigma Chemical Co.)의 상대적 이동도에 따라 분자량을 추정하였다.

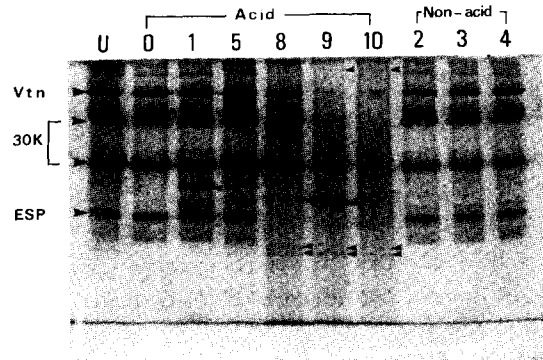
## 結 果

### 可溶性 단백질의 native-PAGE 및 SDS-PAGE

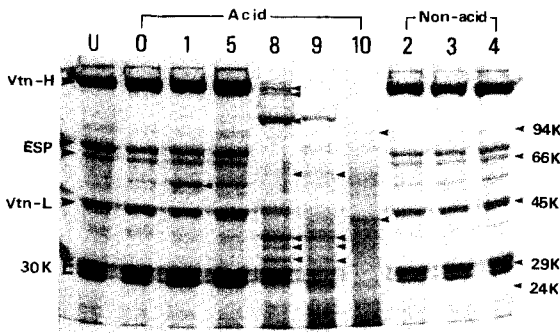
누에알의 배자 발육 시기별 가용성 추출물에 대한 native-PAGE의 분석결과는 그림 1과 같다. 미수정란을 포함하여 침산후 5일까지의 누에알은 vitellin, ESP 및 30K 단백질 등의 주요 난황단백질과 數個의 minor 성분으로 구성되어 있었다.

배자 발육에 따라 나타나는 단백질 성분의 변화는 주로 난황단백질의 減少와 일부 새로운 단백질 성분의 출현이었다. 난황단백질은 그 종류에 따라 감소 패턴이 달랐다. 즉 ESP는 침산후 6일경부터 감소를 나타내기 시작하여 침산후 8일 된 알에서는 단백질 band가 거의 없어졌고, vitellin은 이보다 다소 늦은 침산후 8일부터 감소가 시작되어 9일(최청란)과 10일(개미누에)에서는 거의 흔적적으로 나타나고 있다. 한편 30K 단백질은 침산후 8일까지 단백질 band를 그대로 유지하다가 9일에 감소가 인정되고 부화와 함께 소멸되었다.

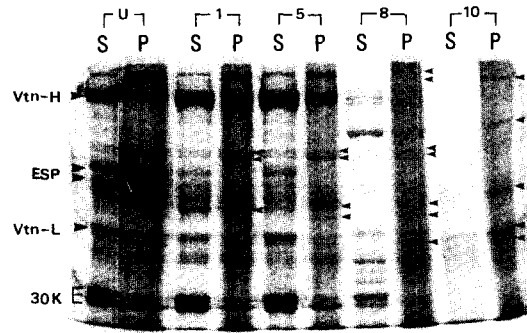
배자의 발육과 함께 몇몇 새로운 단백질들이 출현하였는데 이들은 주로 배자발생의 後半 특히 배자의 형태가 거의 완성된 침산후 8-9일 된 최청란에서 뚜렷하게 나타났으며 이후 부화와 함께 그대로 유지되



**Fig. 1.** Native-PAGE of soluble extracts from silkworm eggs during embryonic development. Vtn, vitellin; 30K, 30K Da proteins; ESP, egg specific proteins; U, unfertilized eggs; Acid means hydrochloric acid treatment at 20 hr after oviposition, and each number represents the elapsed days from the day of acid treatment. Eggs underwent headpigmentation on day 8 and hatched on day 10. Non-acid and each number illustrate elapsed days after oviposition at 25°C. These eggs enter diapause without further embryonic development. Some proteins newly appear with the embryogenesis (arrows).



**Fig. 2.** SDS-PAGE of soluble extracts from silkworm eggs during embryonic development. Vtn-H, vitellin heavy subunit; Vtn-L, vitellin light subunit; Molecular weight of standards in dalton: phosphorylase b(94K), albumine bovine(66K), ovalalbumine(45K), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrase(29K), carbonic anhydrase (24K). New peptides occur with embryogenesis(arrows). See Fig. 1 for further legend.



**Fig. 3.** SDS-PAGE of soluble- and insoluble- extracts from silkworm eggs during embryonic development. U, unfertilized eggs; S, soluble egg extracts; P, insoluble egg extracts; Each number represents the elapsed days after acid treatment. Insoluble extracts specific peptides are increasing in number with embryogenesis (arrows). See Fig. 1 for further legend.

거나 또는 소멸되었다. 그밖에 침산후 1일 경과된 알에서 1개의 성분이 특이하게 나타났는데 이 성분은 미수정란과 침산후 5일된 알에서 1개의 성분이 특이하게 나타났는데 이 성분은 미수정란과 침산후 5일된 알에서 다소 흔적적으로 보일 뿐 그밖의 시기에서는 전혀 발견되지 않았고 같은 난령의 무침산란에서도 검출되지 않았다.

배자 발육 단계별 누에알의 가용성 추출물에 대한 SDS-PAGE의 결과는 native-PAGE의 결과와 완전히 일치하였다(그림 2). 즉 ESP는 2개의 subunits(72K와 69K)로 나뉘어져 침산후 5일까지 존속하다가 이후 분해가 시작되어 8일 경과된 알에는 완전히 소실되어 버렸고, vitellin은 Vit-H와 Vit-L의 subunit로 나뉘어 침산후 6-7일 경까지 존속하다가 8일후부터 급격한 변화를 나타냈다. 30K 단백질은 침산후 8일 경과시 까지 거의 변화를 보이지 않았으나 9일에는 감소현상이 인정되었고 그 1일후 개미누에에서 흔적적으로 검출되었다.

한편 침산후 8일 경과된 알에 數種의 새로운 peptides가 출현하였으나 이후 이들성분은 재차 감소되거나 혹은 소멸되어 버렸다.

**不溶性 단백질(원심 침전물)의 SDS-PAGE**

누에알의 PBS 마쇄물을 원심하여 가용성 분획을 분리시키고 나머지 원심 침전물을 PBS로 충분히洗淨한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과는 그림 3과 같다.

미수정란의 경우, 가용성 추출액과 원심 침전물간의

peptides 성분에는 거의 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 침산후 1일 경과된 누에알의 원심침전물에는 가용성 추출물에서 볼 수 있는 peptides 성분이 그대로 유지되거나 다소 감소하는 한편, 2-3種의 새로운 peptides가 출현하고 있으며 이러한 peptides의 구성 패턴은 침산후 5일된 누에알에서도 유사하게 나타났다.

침산후 8일된 누에알의 원심침전물에는 새로운 peptides 성분이 더욱 추가되고 이 중 몇몇 성분은 개미누에로 발생이 진전됨에 따라 그 농도가 증가하였다.

**考 察**

누에알의 난황단백질은 대부분 vitellin, ESP 및 30K 단백질로 구성되어 있고 이들 단백질들은 그 종류에 따라 분해시거나 분해과정에 차이를 보이고 있음이 보고되고 있다(Irie and Yamashita, 1980, 1983; Indrashith *et al.*, 1987). 본 연구의 결과에서 이미 밝힌 바와 같이 누에알의 가용성 추출물에 대한 배자발육 단계별 난황단백질들의 변화 양상은 native-PAGE와 SDS-PAGE에서 완전히 일치하였다. 즉 난황단백질 가운데는 ESP가 비교적 빠르게 침산후 6일부터 분해가 시작되는 반면 vitellin과 30K 단백질은 이보다 다소 늦게 배자발육이 거의 완성되는 최정란기에 분해가 이루어지고 있으며 또한 SDS-PAGE의 분석결과 ESP와 vitellin은 중간 분해산물들

경유하는 단백질의 단계적 분해가 이루어짐에 반해 30K 단백질은 직접 분해과정에 들어가는 사실 등이 확인되었는데 이러한 결과들은 Indrashith *et al.*(1987)의 연구결과와도 일치하고 있다.

이와같이 난황단백질이 그들의 분해시기, 분해과정 등에 차이를 보이므로써 배자발육 시기에 따라 이용되는 단백질의 종류 및 단백질의 중요성 등을 짐작할 수 있는데 Irie and Yamashita(1983)는 ESP가 배발육에 대단히 중요한 역할을 담당하고 있음을 강조한 반면 상대적으로 vitellin은 배자발육에 필수적인 성분은 아니라고 밝힌 바 있다(Yamashita and Irie, 1980). 또한 난황단백질의 분해가 배자발육 전반에 걸친 점진적인 분해가 아니고 필요한 시기에 2-3일간으로 집중되어 있는 사실도 특정 단백질의 특정시기의 이용이라는 난황단백질 분해의 특성을 말해주고 있다.

Native-PAGE에서 침산후 1일 경과된 알에 나타난 1개의 단백질 성분은 이 band가 침산 당일이나 또는 침산후 2-3일 경과한 알에서 전혀 검출이 안된다는 점에서 注目할 필요가 있다. 침산후 1일이면 산란후 2일 경과된 알로서 같은 난령의 무침산란에서도 이 단백질은 검출이 안되는데(그림 1) 산란후 2일이면 배자가 서서히 휴면에 들어가기 시작하는 시기로서 이 점을 감안하면 아마도 이 성분은 침산 처리에 의한 휴면의 억제와 그에 따른 배자발육의 진행과 관련된 특이한 성분이 아닌가 생각된다(Kai and Hasegawa, 1972; Kai and Nishi, 1976). 이 단백질은 SDS-PAGE상에서 분자량 약 50K 정도의 단백질로 나타나고 있다.

침산후 8일된 누에알의 SDS-PAGE에서는 여러개의 peptides가 새로이 나타나는데 Indrasith *et al.*(1987)은 면역화학적 同定法에 의해 이들 peptides가 vitellin과 ESP의 단계적 분해에 의한 대사중간산물임을 밝힌 바 있다. 그러나 같은 시기에 Native-PAGE에서 새로이 나타난, 비교적 이동도가 빠른 몇몇 단백질 성분들이 난황단백질의 분해산물인지, 아니면 배자발육과 함께 새로이 합성된 단백질들인지는 현재의 실험결과 만으로 단정하기 어렵다.

한편, 누에알 마쇄액의 원심 상층액과 원심 침전물에 대한 SDS-PAGE의 결과를 비교하면 미수정란의 경우 兩者間에 차이가 없었으나 침전후 배자의 발육이 진전됨에 따라 원심침전물 분획에서는 가용성 단백질에서 볼 수 없는 새로운 peptides들이 출현하고 그 수는 배자의 발육 후기로 갈수록 증가하여 개미누에의 경우는 양자간에 차이가 더욱 뚜렷하였다. 이와같이 배자발육 후기의 원심침전물에 나타나는 數種의 pep-

tides는 배자의 형태과정에 따른 구조단백질로 생각되며 이들 단백질들이 발육후기로 갈수록 peptides의 수나 농도가 증가하는 것은 그만큼 배자의 형태구축이 진전되었음을 의미하는 것으로 생각된다. 단, 이들 新生 단백질들의 출현이 난황단백질의 중간분해산물의 직접적인 이용인지 아니면 유전자의 발육 program에 의한 새로운 단백질 합성의 결과인지(河口・藤井, 1984)는 앞으로의 연구과제로 남긴다.

## 摘 要

누에알의 배자발육 단계별 가용성 단백질과 불용성 단백질에 대한 native-PAGE와 SDS-PAGE 분석을 하였다. 가용성 단백질의 대부분은 ESP, vitellin, 30K 단백질로 구성되어 있었고 배자발육 시기별 난황단백질의 변화는 native-PAGE와 SDS-PAGE에서 일치하였다. 배자발생의 후기에는 난황단백질의 분해산물로 보이는 數個의 peptides가 검출되었고 침산처리 후 1일된 알에서 1개의 특이한 단백질이 출현하였다.

누에알 마쇄물의 원심침전물에 대한 SDS-PAGE 분석결과 배자의 형태형성을 위한 구조단백질로 보이는 數種의 peptides가 배자발육의 진전과 함께 새로이 검출되었다.

## 引 用 文 獻

- Bownes, M. and B. D. Hames(1977) Accumulation and degradation of three major proteins in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, **200** : 149-156.
- 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.
- Irie, K. and O. Yamashita(1980) Changes in vitellin and other yolk proteins during embryonic development of 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.
- Kai, H. and K. Hasegawa(1972) Studies on the mode of action of the diapause hormone with special reference to the protein metabolism in the silkworm, *Bombyx mori* L. III. Effects of acid-treatment and detergents on esterase A in diapause development in *Bombyx* eggs in relation to esterase A activity. *J. Insect Physiol.* **22** : 1315-1320.
- 河口 豊・藤井 博(1984) カイコの胚子形成過程におけるタンパク質合成の變動. 應動昆 **28**(2) : 68-74.

- McGregor D. A. and B. G. Loughton(1974) Yolk protein degradation during embryogenesis of the African migratory locust. *Can. J.Zool.* **52** : 907-917.
- Roberts, D. B. and G. Graziosi(197) Protein synthesis in the early *Drosophila* embryo: analysis of the protein species synthesized. *J. Embryolo. Exp. Morphol.*, **41** : 101-110.
- 成洙—(1984) 家蠶의 中腸變態에 관한 內分泌學的 研究. 韓蠶誌 **26**(1) : 30-34.
- 成洙—(1986) 누에 體液主蛋白質에 관한 生化學的 研究. 韓蠶誌, **28**(1) : 30-36.
- Storella, J. R., D. M. Wojchowski and G. C. Kunkel (1985) Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **15** : 259-275.
- Tilden, R. L. and S. M. Ferkovich (1987) Regulation of protein synthesis during egg development of the parasitic wasp, *Microplitis croceipes* (Cresson) (Braconidae). *Insect Biochem.* **17** : 783-792.
- Yamashita, O. and K. Irie(1980) Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of silkworm. *Nature, Lond.* **283** : 385-386.
- Zhu, J., L. S. Indrasith and O. Yamashita(1986) Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30K Da protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **882** : 427-436.