

동남참게(*Eriocheir japonicus*)의 난황단백질 정제와 그 전구체의 합성부위 구명

한창희 · 배현환
동의대학교 생물학과

Purification of the Yolk Protein, and Identification of the Synthetic Site of Its Precursor in *Eriocheir japonicus* (Decapoda, Brachiura)

Chang-Hee HAN and Hyun-Hwan BAE
Department of Biology, Donggeui University, Pusan 614-010, Korea

To identify the histological site of synthesis of yolk protein precursor, vitellogenin, by immunocytochemical method in the freshwater crab *Eriocheir japonicus*, we purified the yolk protein, vitellin, from crude egg extracts, and prepared the anti-rabbit serum against vitellin. Then, the site of vitellogenin synthesis was demonstrated by immunocytochemical method with PAP(peroxidase-antiperoxidase) reaction using the rabbit antiserum against vitellin.

Female specific serum protein was identified in female serum by immunoelectrophoresis and Ouchterlony's immunodiffusion test for mature male and female sera. Based on the immunoelectrophoresis and Ouchterlony's diffusion test for mature male and female sera and crude egg extracts using antiserum against vitellogenic female serum absorbed with male serum, the female specific serum protein was identified as vitellogenin, detected in female serum only. The major yolk protein, vitellin, was purified from the crude egg extracts by DEAE-cellulose ion exchange chromatography, followed by sepharose CL-4B gel filtration chromatography. The molecular weight of vitellin was estimated to be about 245,000 dalton by sepharose CL-4B gel filtration chromatography. From the results of immunological analysis for vitellin, it was found that the vitellin antiserum contained the antibody against vitellogenin. In the results of immunocytochemical reaction by PAP method with the rabbit antiserum against vitellin, the vitellogenic oocytes and the hepatopancreas of mature female showed positive PAP reaction, but not in follicle cells and previtellogenic oocytes of ovary, muscle of female and mature male hepatopancreas. Therefore, it showed that the hepatopancreas of mature female is the site of vitellogenic synthesis.

서 론

축적기구에 관한 연구는 주로 파충류, 조류, 양서류 및 어류에서 이루어져 왔으며, 절족동물에서는 주로 곤충류에서 많은 연구가 이루어져 왔다. 곤충류 난황물질의 주체를 이루는 난황단백질의 형성과

에서 난황단백전구체(vitellogenin)는 JH(juvenile hormone)의 작용에 의하여 지방체에서 합성되어 난내에 축적되어 진다는 것은 여러 연구자에 의하여 밝혀졌다(Brookes, 1969; Pan *et al.*, 1969; Hagedorn and Judson, 1972; Chen *et al.*, 1979; Zhai *et al.*, 1984; Chinzei and Yano, 1985).

그러나, 갑각류에서는 난황단백질의 형성과 축적에 대한 내분비학적 기구 뿐만 아니라 난황단백전구체의 합성부위에 대해서도 체계적인 구명이 확실하게 되어지지 않고 있는 실정이다. 난황단백전구체의 합성부위에 대해서는 이미 생화학적인 방법과 전자현미경을 이용한 조직학적인 방법에 의하여 그 합성부위가 연구자의 실험방법과 종에 따라 난소(Beams and Kessel, 1963; Lui *et al.*, 1974; Lui and O'Connor, 1976; Fyhn and Costlow, 1977), 간체장(Wolin *et al.*, 1973) 또는 혈구(Kerr, 1968)라고 여러가지로 보고되어져 왔으나, 최근에는 면역조직화학적 방법을 이용하여 합성부위를 명확하게 구명하려고 하는 연구들이 진행되어 지고 있다. 이러한 연구들에 의하면 등각류와 단각류에서는 난황단백전구체가 피하조직에 발달된 지방세포에서 합성되어 진다는 것이 새롭게 밝혀지고 있다(Souty and Picaud, 1981; Meusy *et al.*, 1983). 또한, 十脚類에서는 보리새우, *Penaeus japonicus*(Yano and Chinzei, 1987)에서 난소내의 여포세포가 난황단백전구체를 합성하고 있다고 보고된 반면, 담수산 새우류 *Macrobrachium nipponense*(Han, 1988)와 게류 *Libinia emarginata*와 *Carcinus maenas*(Paulus and Laufer, 1987)에서는 간체장이 난황단백전구체의 합성부위라고 밝히고 있다. 아직은 단지 4종에 대해서만 연구되어졌기 때문에 십각류에서 난황단백전구체의 합성부위에 대한 체계적인 설명을 할 수 없지만, 종에 따라 다소 차이가 있음을 보여주고 있다.

본 연구에서는 십각류중 담수와 기수역에 서식하는 동남참게의 난황형성과 그 축적기구를 밝히기 위한 연구의 일환으로 난황단백전구체의 합성부위를 구명하고자 하였다. 면역조직화학적인 방법을 이용하여 합성부위를 명확히 구명하기 위하여, 우선 난황단백질을 난소난으로 부터 정제하고 이들의 항혈청을 제작하여 면역학적인 성질을 밝혔으며, 난황단백전구체와 동일한 항원성을 가진 난황단백질에 대한 항체를 사용한 PAP(peroxidase-antiperoxidase)법에 의하여 난황단백전구체의 합성부위를 구명하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1989년 1월부터 3월에 걸쳐서 경남 하동군 하저구에 위치한 섬진강변에서 성숙한 암수 동남참게를 채집하여 동의대학교 실험실로 옮긴 후, 체액은 3ml주사기를 이용하여 보자의 기절부로 부터 채혈하였으며, 채혈된 혈액은 4℃, 10,000×G에서 30분간 원심하여 혈청을 분리하고 이를 실험에 사용할 때까지 -60℃에 보관하였다. 또한, 이들 암수 참게들의 간체장, 근육 및 생식소를 절취하여 PLP(periodate lysine paraformaldehyde) 고정액에 6시간 고정한 후, 에틸알콜로 탈수하여 paraffin포매하였다.

2. 난황단백질의 분리 및 정제

성숙한 암참게로 부터 절취한 난소난 1.5g을 0.01 M PBS(pH 7.5) 완충액으로 충분히 세척한 후, 동일한 완충액 5ml를 넣어 glass homogenizer로 마쇄하여 4℃, 10,000×G에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액 1ml에 100% 포화시킨(NH₄)₂SO₄를 3ml넣어 충분히 혼합한 후, 10,000×G에서 30분간 원심시켜 얻은 침전물을 상기한 완충액으로 용해시키고, 이를 0.02M Tris-HCl(pH 7.5) 완충액으로 투석하여 (NH₄)₂SO₄를 제거시켜 이를 粗卵黃蛋白 추출액으로 하였다. 이 조난황단백 추출액은 이미 상기한 Tris-HCl완충액으로 平衡化한 DEAE-cellulose column(φ 2.5cm×20cm)에 넣어 흡착시킨 후, 상기한 Tris-HCl완충액과 0.5M NaCl이 들어 있는 같은 Tris완충액을 이용하여, 4.4 mM/tube의 농도구배로써 분획을 하였다. 여기서 얻은 peak I을 분리하여 상기의 Tris-HCl완충액에 투석한 후, 동일한 완충액을 이용하여 sepharose CL-4B의 gel chromatography column(φ 2.5cm×70 cm)으로 gel chromatography를 행하여 난황단백질을 분리하였다. 분리된 난황단백질의 분자량은 standard로 alcohol dehydrogenase(MW: 150,000), β-amylase(MW: 200,000), apoferritin(MW: 430,000), thyroglobulin(MW: 669,000)을 이용하여 sepharose CL-4B column에 의한 gel chromatography법으로 추정하였다.

3. 항혈청 및 흡수항혈청 제작

성숙한 암·수의 혈청에 대한 항혈청은 Newbould(1965)의 방법을 응용하여 토끼에 면역시켜

결 론

었었다. 이때 항원은 혈청시료와 동량의 Freund adjuvant를 혼합하여 유화시켜 사용하였다. 1회째의 항원은 각각의 암·수혈청 0.5ml에 complete adjuvant를 혼합하여 피하주사 하였다. 2회째 부터의 항원투여는 혈청에 incomplete adjuvant를 혼합하여 1회째 항원투여 후 1주일 간격으로 4회에 걸쳐 같은 양의 항원을 같은 방법으로 피하에 투여하였다. 마지막 항원투여 후 1주일 후에 경동맥을 절단하여 전체혈을 하였다. 채혈한 혈액으로 부터 분리한 항혈청은 -60℃에 보관하였다. 정제된 난황단백질에 대한 항혈청도 참개의 혈청에 대한 항혈청 제작과 동일한 방법에 의하여 얻었다. 그리고, 흡수항혈청은 암참개 혈청에 대한 항혈청 1ml에 수참개 혈청 2ml를 넣어 37℃에서 5시간 반응시킨 후 10,000×G에서 30분간 원심분리하여 얻어 -60℃에 보관하였다.

4. 전기영동, 면역전기영동 및 면역확산 실험

전기영동: 5% polyacrylamide gel을 이용하여 Davis(1964)의 방법에 따라 normal PAGE 전기영동을 행하였다. 단백질 band의 염색은 coomassie brilliant blue R-250을 45% ethanol과 45% acetic acid에 녹혀 0.25%의 농도로한 염색액을 사용하였다.

면역전기영동: 0.1M tris 완충액(pH 8.6)을 사용하여 agarose 1.2%의 용액을 만들어 영동용 gel을 제작하였다. 영동용 완충액은 0.2M tris(pH 8.6)을 사용하였으며, 통전은 지지체의 폭 1cm당 1.5mA로써 1시간 동안 행하였다.

면역확산: 0.1M phosphate 완충액(pH 7.4)을 사용하여 agarose 1.2% 용액을 만들어 Ouchterlony의 면역확산용 지지체를 제작하여 이미 만들어 놓은 참개 암수혈청에 대한 항혈청, 흡수항체 및 난황단백질에 대한 항혈청 각각에 대하여 암수 혈청, 난소난에서 추출한 조난황단백 추출액 그리고 정제된 난황단백질에 대한 침강반응을 조사하였다.

5. PAP(peroxidase-antiperoxidase)법에 의한 난황단백전구체의 합성부위의 동정

난소난 추출액으로 부터 분리·정제한 난황단백질을 토끼에 면역시켜 얻은 항혈청을 이용하여 Sternberger 등(1970)의 방법을 변형한 Han(1988)의 방법에 의하여 이미 만들어 놓은 paraffin포매한 간체장, 근육 및 난소를 3μm 두께의 절편을 만들어 효소 항체반응을 시켜 합성부위를 찾아냈다.

1. 암특이성 혈청단백질의 존재와 난황단백질과 관계

성숙중인 암참개와 수참개의 혈청과 난소난에서 추출한 조난황단백질의 면역전기영동 양상을 Fig. 1에 나타냈다. 암참개 혈청에 대한 항체(aF)에 대하여 암참개 혈청(F)은 시료의 well부근에 화살표로 가르키는 바와 같이 명료한 1개의 침강선과 양극측으로 4~5개의 긴 침강선이 나타나는 반면, 수참개 혈청(M)은 양극측으로 4~5개의 긴 침강선이 나타났었다(Fig. 1-A). 또한 수참개의 혈청에 대한 항혈청(aM)에 대해서는 암수 혈청(F, M) 모두 같은 양상의 침강선이 나타났었다(Fig. 1-B). 난소난에서 추출한 조난황단백(E)은 암참개 혈청에 대한 항혈청(aF)에 대하여서는 시료의 well부근에 1개의 침강선과 양극측에 1개의 침강선이 나타났으며, 수참개 혈청에 대한 항혈청(aM)에 대하여서는 양극측에만 1개의 침강선이 나타났었다.

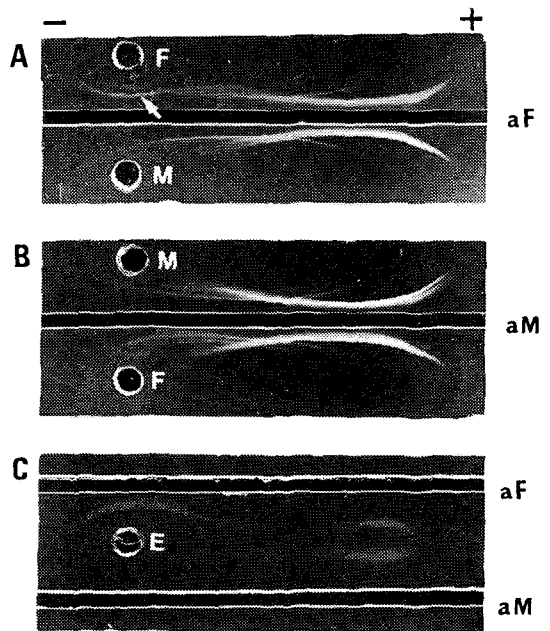


Fig. 1. Immunoelectrophoresis of vitellogenic female serum(F), mature male serum(M) and crude egg extracts(E) against the rabbit antisera to vitellogenic female serum(aF) and mature male serum(aM). Arrow indicates a precipitin line of the female specific serum protein.

그리고, 암참게 혈청에 대한 항혈청에 수참게 혈청을 넣어 흡수시킨 흡수항혈청(aF-M)과 암참게 혈청에 대한 항혈청(aF)을 이용하여 암수 참게혈청과 조난황단백 추출액 각각에 대하여 면역전기영동을 한 결과에 의하면(Fig. 2-A), 수참게 혈청(M)은 항 암참게 혈청(aF)에 대하여서는 양극측에 4~5개의 긴 침강선이 나타나지만 흡수항혈청에 대하여서는 침강선이 전혀 나타나지 않았다. 그러나, 암참게 혈청(F)과 조난황단백추출액(E)은 흡수항혈청에 대하여 시료의 well부근에 명료한 1개의 침강선을 형성하였다.

이상의 Fig. 1과 Fig. 2-A에 나타난 결과로 암참게 혈청과 조난황단백추출액에는 수참게 혈청에는 존재하지 않은 암특이성 혈청단백질이 존재하고 있음을 알 수 있다.

이러한 암참게 혈청중에 존재하는 암특이성 혈청단백질과 난소난으로 부터 추출한 조난황단백추출액에 존재하는 난황단백질과는 동일한 항원성을 갖는지를 알아보기 위하여, 이들에 대하여 Ouchterlony면역확산 test를 하였다(Fig. 2-B). Fig. 2-B에 나타난 바와 같이 흡수항혈청(aF-M)에 대하여 수참게 혈청(M)은 침강선이 형성되지 않은 반면, 암참게 혈청(F)과 조난황단백추출액(E)은 각각 1개의 침강선이 형성되었으며 이들 침강선은 서로 융합하고 있어서 서로 동일한 항원성을 가지고 있음을 알 수 있다. 따라서 성숙한 암참게의 혈청중에만 존재하는 암특이혈청 단백질은 난황단백전구체(Vitellogenin)임을 알 수 있다. ?

2. 난황단백질(vitelin)의 정제

DEAE-cellulose 이온교환 chromatography와 sepharose CL-4B gel chromatography를 이용하여 조난황단백추출액으로 부터 난황단백전구체와 동일한 항원성을 갖는 난황단백질을 분리·정제하였다. 조난황단백추출액의 DEAE-cellulose 이온교환 chromatography column에 의한 용출 pattern을 Fig. 3에 나타내었다. 염농도 0.088M NaCl과 0.286M NaCl에서 각각 1개의 peak가 나타났으며, peak I에는 487 nm의 파장에서 최대 흡광도를 나타내는 황갈색의 색소를 함유하고 있었다.

용출된 2개의 peak 중에서 암참게 혈청내에 존재하는 암특이혈청 단백질과 동일한 항원성을 갖는 단백질 peak를 찾아내기 위하여, 암참게 혈청에 대한 항체와 수참게 혈청에 대한 항체를 이용하여 용출된 2개의 peak(I 과 II)와 조난황단백추출액에 대한 Ouchterlony면역 확산 test를 행하여, 그

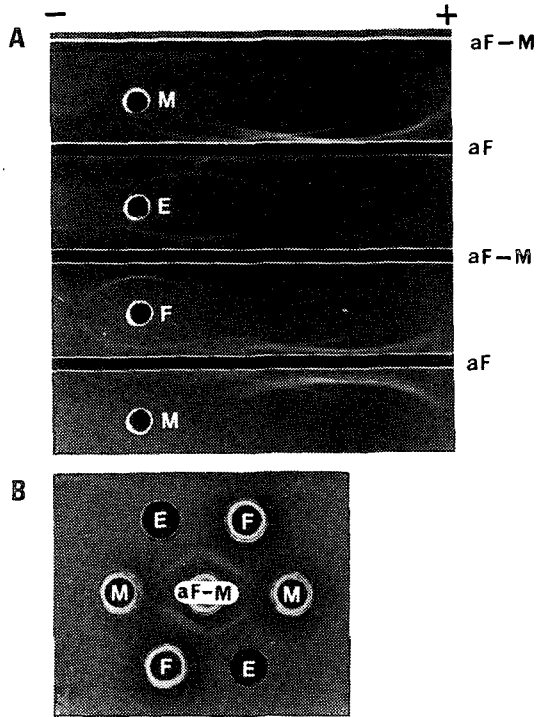


Fig. 2. Immunelectrophoresis(A) and Ouchterlony's immunodiffusion test(B) of vitellogenic female serum(F), male serum(M) and crude egg extracts(E) against the rabbit antiserum to vitellogenic female serum(aF) and the rabbit antiserum to vitellogenic female serum absorbed with mature male serum(aF-M).

결과를 Fig. 4에 나타내었다. peak I 과 II (PI과 PII)는 암참게 혈청에 대한 항체(aF)에 대하여 각각 1개의 침강선을 형성하고 있다. 그리고, 조난황단백추출액(E)은 2개의 침강선을 형성하고 있으며, 이들 2개의 침강선중에서 중앙 well부근에 위치한 침강선은 peak I 과 융합하고 있으며, 그 바깥쪽에 위치한 침강선은 peak II와 융합하고 있다(Fig. 4A). 또한 수참게 혈청에 대한 항체(aM)에 대해서 peak I (PI)은 전혀 침강선이 형성되지 않은 반면, 조난황단백추출액(E)과 peak II(PII)는 각각 1개의 침강선을 형성하면서 이들은 서로 융합하고 있었다. 이러한 Fig. 4의 결과로 부터 peak I 만이 암특이성 혈청단백질과 동일한 항원성을 갖는 난황단백질의 peak임을 알 수 있었다. peak I 의 분획을 sepharose CL-4B gel chromatography에 의하여 재용출시킨 결과, Fig. 5와 같이 두개의 peak를 얻을 수 있었다. 이들 중, 주 peak인 peak

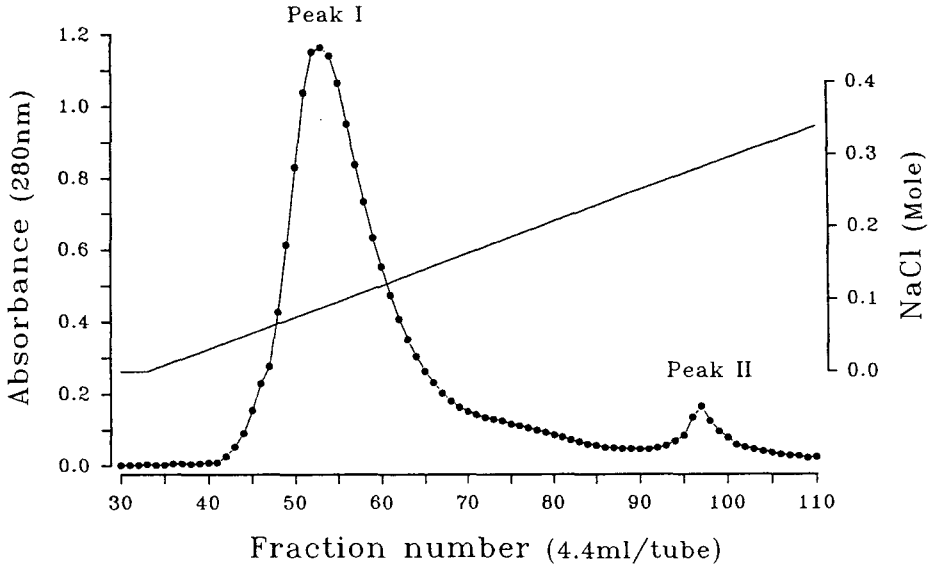


Fig. 3. The elution pattern of crude egg extracts dialyzed against 0.02M Tris-HCl buffer(pH 7.5) on a DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Elution buffer was used 0.02M Tris-HCl(pH 7.5) buffer, and gradient of NaCl concentration was 4.4mM NaCl/tube. Two elution peaks(Peak I and Peak II) were obtain and pooled.

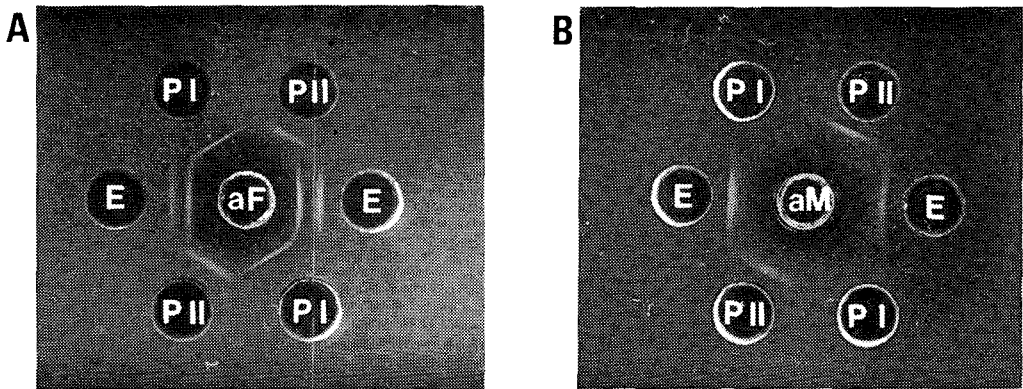


Fig. 4. Ouchterlony's immunodiffusion test of elution peaks I and II(PI and PII) of Fig. 3 and crude egg extracts(E) against rabbit antisera to vitellogenic female serum(aF) and mature male serum(aM).

1을 분획하여 normal PAGE 전기영동을 한 결과, 1개의 단일 band가 나타났다(Fig. 6). 분리된 난황 단백질의 항원성을 조사하기 위하여 분리된 난황 단백질을 토끼에 주사하여 얻은 항 난황단백 혈청과 암수 참게의 혈청에 대한 항혈청을 이용하여 조난황단백축출액, 분리한 난황단백질 그리고 성숙한 암수 참게 혈청에 대하여 면역전기영동과 Ouchterlony 면역확산 test를 하였다(Fig. 7과 Fig. 8). Fig. 7에서, 조난황단백축출액(E)과 분리한 난황단

백질(Y) 및 암참게 혈청(F)들은 항 난황단백혈청(aY)에 대하여 1개의 명료한 침강선이 형성하고 있었다. 그러나, 수참게 혈청(M)은 항 난황단백혈청(aY)에 대하여 전혀 침강선을 형성하지 않았다. 그리고, Fig. 8에서 나타난 바와 같이 Ouchterlony 면역확산 test에서 항 난황단백혈청(aY)에 대하여 분리한 난황단백질(Y)과 암참게 혈청(F)은 각각 1개의 침강선을 형성하였으며, 이들 침강선은 서로 융합하고 있었다. 이 결과로 분리한 난황단백질은

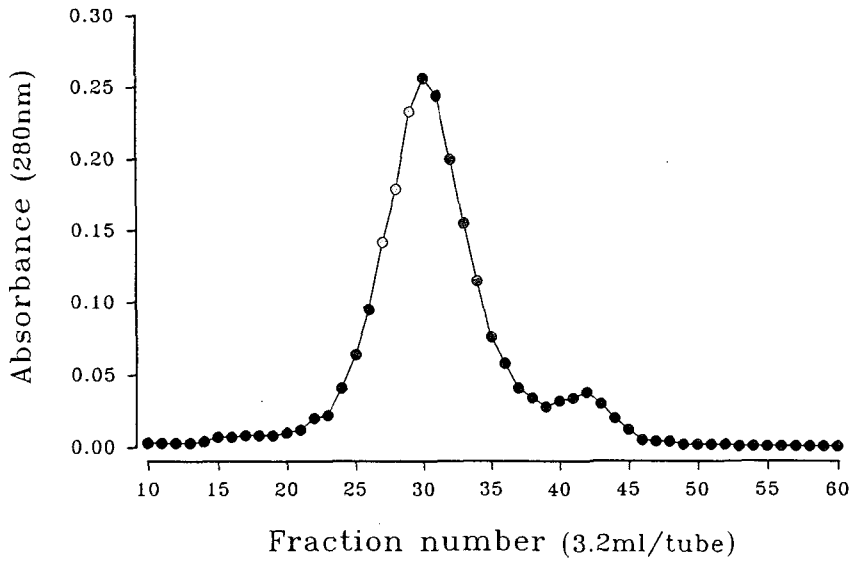


Fig. 5. The elution pattern of first main peak in Fig. 3(peak 1) on a sepharose CL-4B gel chromatography. Elution buffer was used 0.02M Tris-HCl(pH 7.5). The first main peak was pooled.

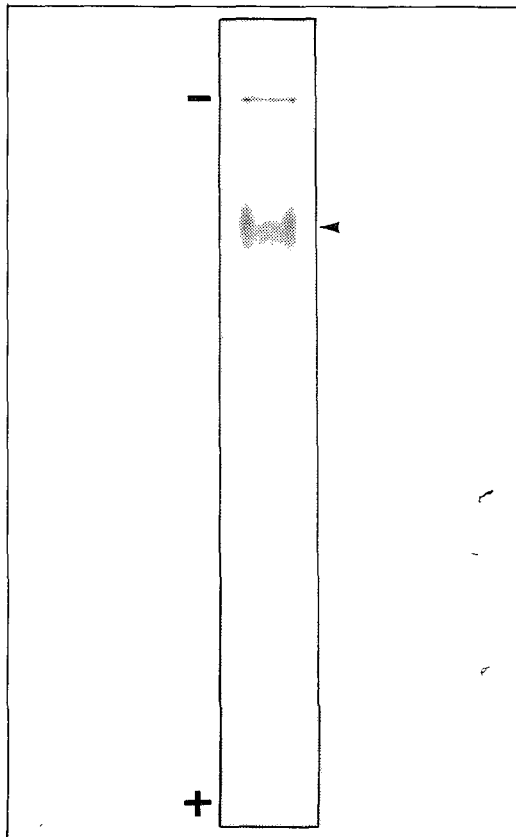


Fig. 6. Normal 5% polyacrylamide gel electrophoresis pattern of the first main peak of Fig. 5.

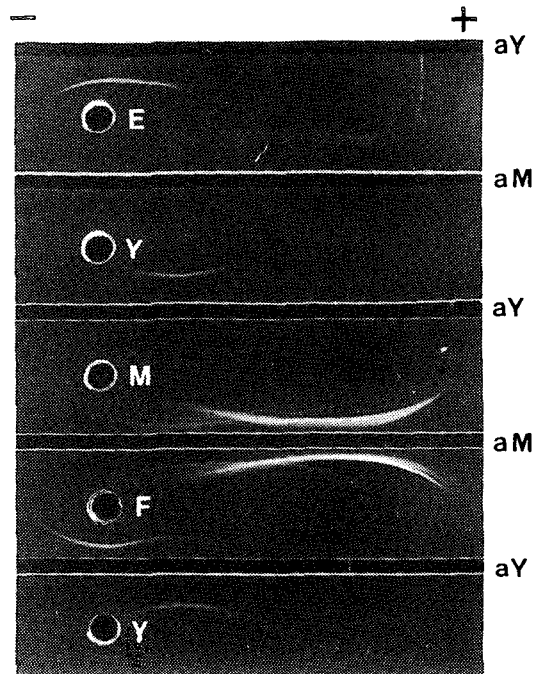


Fig. 7. Immunoelectrophoresis of crude egg extract (E), purified yolk protein(Y), vitellogenic female serum(F) and mature male serum(M) against rabbit antisera to purified yolk protein (aY) and mature male serum(aM).

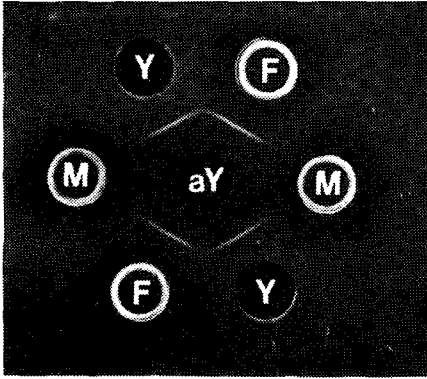


Fig. 8. Ouchterlony's immunodiffusion test of purified yolk protein(Y), mature male and female sera (M and F) against rabbit antiserum to purified yolk protein(aY).

암참게 혈청중에 존재하는 난황단백전구체와 동일한 항원성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서, 분리한 난황단백질을 정제 난황단백질로 하고, 이 난황단백질에 대한 항혈청을 난황단백전구체의 합성부위를 구명하기 위한 면역조직화학방법에 사용하였다. 그리고, 분리·정제된 난황단백질의 분자

량을 gel 여과법에 의하여 분석한 결과, Fig. 9에서 나타난 바와 같이 난황단백질의 용출위는 β -amylase(MW: 200,000)와 Apoferritin(MW: 443,000)의 사이로서 분자량은 약 245,000 dalton으로 추정할 수 있었다.

3. PAP법에 의한 난황단백전구체(vitellogenin)의 합성부위의 동정

분리·정제된 난황단백질에 대한 항혈청을 사용하여 PAP법으로 난원세포기에서 부터 난황형성기까지의 난모세포들을 관찰할 수 있는 난소의 절편에 대하여 면역조직화학반응을 시킨 결과(Fig. 10), 난황구가 축적되어 있는 난황형성기의 난모세포에 대하여서는 강한 양성반응을 나타내었으나, 난황형성전의 난모세포들은 전혀 반응이 나타나지 않았으며, 또한 난모세포를 둘러싸고 있는 여포세포들에서도 전혀 반응이 나타나지 않았다(Fig. 10-1). 그리고 성숙중인 암참게의 간체장의 세포에서는 양성반응이 나타났으나(Fig. 10-2), 수참게의 간체장의 조직에는 전혀 반응이 나타나지 않았다(Fig. 10-4). 또한 암참게의 근 조직에서도 PAP의 양성반응이 나타나지 않았다(Fig. 10-3).

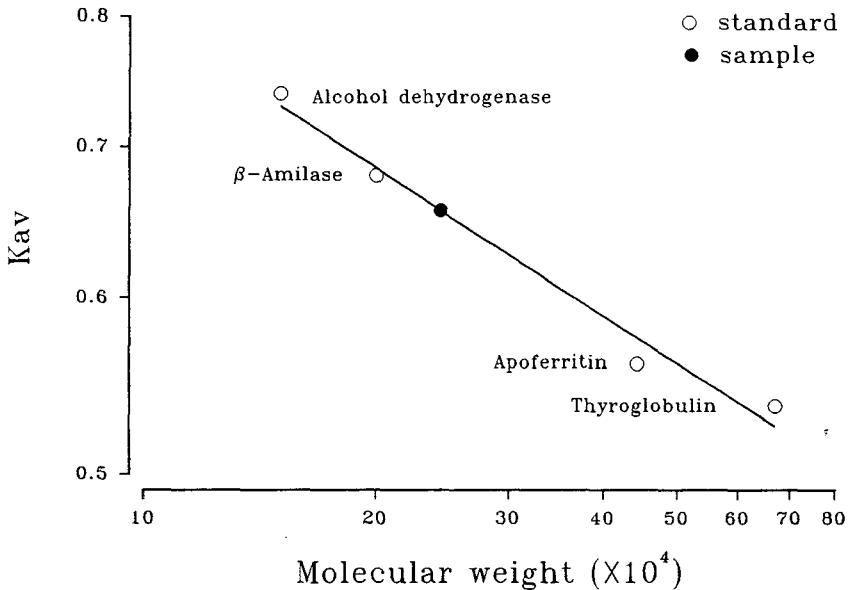


Fig. 9. Determination of molecular weight of the purified yolk protein by gel chromatography of sepharose CL-4B column(ϕ 2.5cm \times 70cm). The molecular weight of yolk protein was estimated to be about 245,000 dalton.

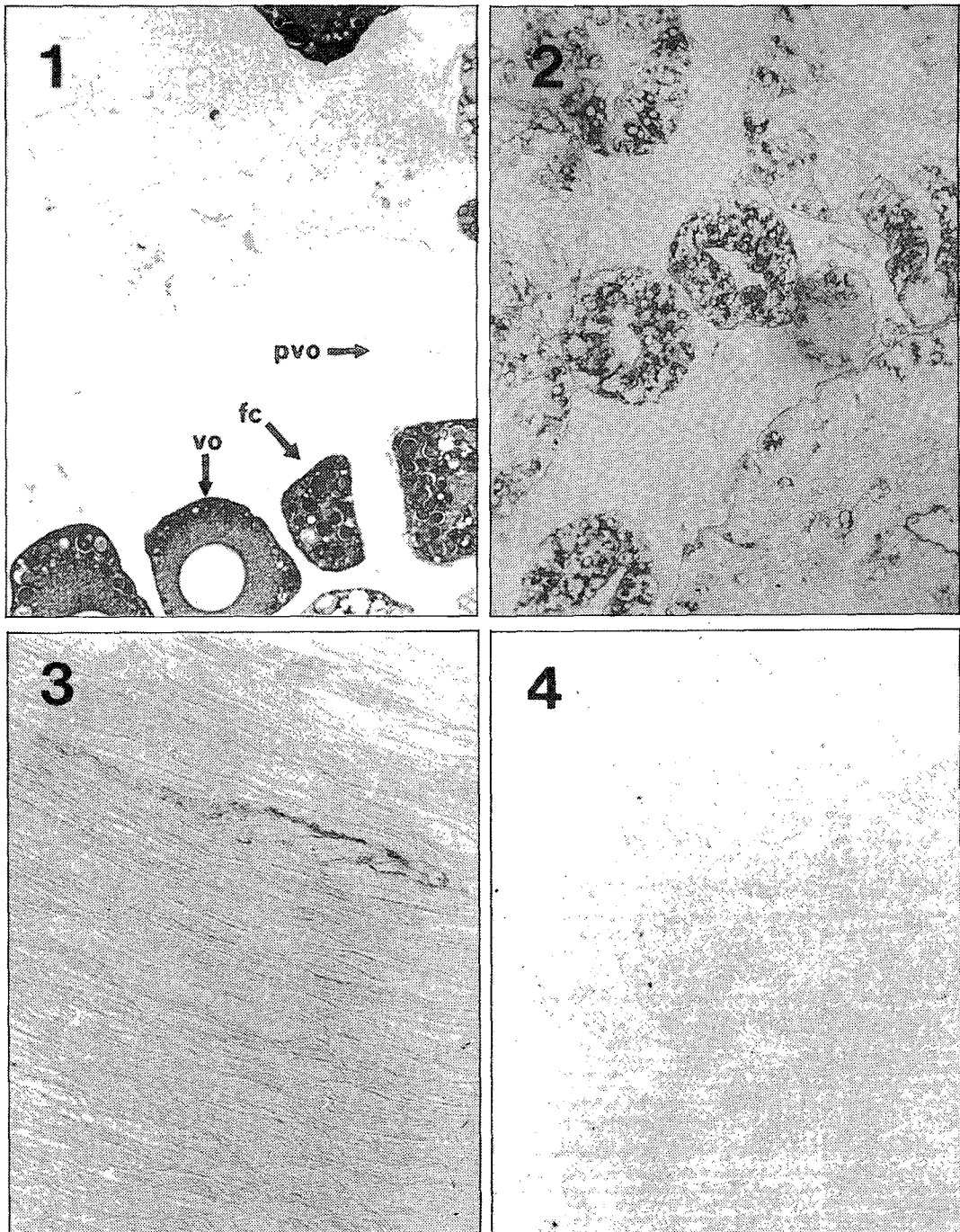


Fig. 10. PAP reaction of ovary (1), vitellogenic female hepatopancreas (2), vitellogenic female muscle (3) and mature male hepatopancreas (4) using rabbit antiserum to purified yolk protein. pvo: previtellogenic oocyte; vo: vitellogenic oocyte; fc: follicular cell layer.

고찰

갑각류에서 난황단백질과 암투이성혈청단백질과의 관계에 대한 연구는 Frenz(1960)에 의하여 개類에서 처음으로 암투이성혈청단백질(female-specific serum protein)의 존재가 보고된 이후, 계류의 *Paratellusa hydrodromous*(Adiyodi, 1968), *Uca pugilator*, *Cambarus clarkii*, *Libinia emarginata*(Wolin et al., 1973), 등각류의 *Porecellio dilatatus*와 *Ligia oceanica*(Besse and Mocquard, 1968), 단각류의 *Orchestica gammarella*(Meusy et al., 1969), 새우류의 *Palaemon paucidens*(Nakagawa et al., 1982)에서 암투이성혈청단백질의 존재를 구명하였으며, 또한 이 단백질이 난소내의 난모세포에 축적되어 난황단백질로 된다고 보고된 바 있다. 본 연구에 있어서도 동남참게, *E. japonicus*의 조난황단백질축출액과 암수 참게혈청을 각각 면역시켜 얻은 항혈청과 흡수 항혈청을 이용하여 성숙중인 암수 참게혈청 및 조난황단백질축출액의 면역전기영동과 Ouchterlony 면역확산 test(Fig. 1과 2)에 의하여, 본 종의 성숙중인 암참게의 혈청중에는 수참게 혈청에는 전혀 존재하지 않는 암투이성혈청단백질(female-specific serum protein)이 존재하고 있음이 구명되었다. 그리고 이 암투이성혈청단백질은 난황단백질과 서로 공통의 항원성을 갖고 있음을 알 수 있으며, 따라서, 암투이성단백질은 난소내의 난모세포로 移行되어지는 난황단백질전구체 즉, vitellogenin임을 확인할 수 있었다.

난황단백전구체와 공통의 항원성을 갖는 난황단백질의 분리·정제를 한 실험에서 정제된 동남참게의 난황단백질의 분자량은 245,000 dalton으로 추정되었다(Fig. 9). 한편, Wallace 등(1967)은 lobster에 속하는 *Homarus americanus*, 집계류에 속하는 *Pagurus pollicaris*, 계류에 속하는 *Uca pugilator*, *Sesarma reticulatum*, *Libinia emarginata* 및 *Cancer irroratus*에서 분리된 난황단백질의 분자량은 각각 360,000, 370,000, 340,000, 350,000, 370,000 및 330,000 dalton이라고 보고하고 있으며, Lui and O'Connor(1976)는 계류의 *Pachygrapsus crassipes*에서 SDS전기영동법에 의하여 난황단백질은 분자량이 180,000, 105,000 및 83,000 dalton인 3개의 subunit로 이루어져 있다고 보고하고 있다. 이러한 결과와 비교할 때 동남참게의 난황단백질의 분자량은 다른 종들에 비해 다소 적음을 알 수 있으나 큰 차이는 없었다.

이러한 난황단백질의 전구체인 vitellogenin은 어

디에서 합성되어지고 있는지에 대하여 많은 관심과 연구가 진행되어 왔다. Beams and Kessel(1963)은 가제류에서 난세포의 전자현미경적인 관찰에 의하여 주된 난황단백질은 난모세포에 발달한 粗面小胞體에서 유래되며, 난모세포막에 형성된 microvilli의 micropinocytosis에 의하여 들어온 단백질은 극히 일부에 지나지 않는다고 보고하였으며, Hinsch and Cone(1969)은 계류의 *Libinia emarginata*에서, Fyhn and Costlow(1977)는 만각류의 *Balanus amphitrite*와 *B. eburneus*에서 조직학적관찰에 의하여 Beams and Kessel(1963)과 같은 결과를 보고하였다. 또한, Lui 등(1974)과 Lui and O'Connor(1976)는 생화학적면에서 가제류의 *Procambarus* sp.와 계류의 *Pachygrapsus* sp.에서 난소가 vitellogenin을 합성하고 있다고 보고하고 있다. 반면, Kerr(1986)는 계류의 *Callinectes sapidus*의 근육조직, 심장, 간체장 및 혈림프의 배양실험에서 hemocyte가 vitellogenin합성장소일 가능성이 크다고 보고하였다. 또한, Wolin 등(1973)은 계류의 *Uca pugilator*와 *Libinia emarginata*에서 간체장의 추출액과 雄혈액으로 흡수시킨 抗雌血液혈청과의 면역학적 반응에 의하여 간체장이 vitellogenin합성부위라고 보고하였다.

그러나, 최근에 면역조직화학적방법에 의하여 等脚目的 *Porcellio dilatatus*(Picaud, 1980)와 端脚目的 *Orchestia gammarella*와 *O. mediterrane*(Meusy et al., 1983)에서 난황단백전구체의 합성부위가 피하에 있는 지방세포들이 새로이 밝혀졌으며, 十脚目에서는 보리새우, *Penaeus japonicus*(Yano and Chinzei, 1987)가 난소내의 여포세포에서 vitellogenin을 합성하고 있는 반면, 해수에 서식하는 계류인 *Libinia emarginata*와 *Carcinus maenas*(Paulus and Laufer, 1987)와 담수산 새우류인 징거미새우, *Macrobrachium nipponense*(Han, 1988)는 간체장에서 난황단백전구체를 합성하고 있음을 밝혀냈다. 본 연구에서 동남참게의 난황단백전구체의 합성부위를 규명하기 위하여, PAP법에 의하여 난소, 간체장 및 근육에 대한 면역조직화학 반응을 시킨 결과(Fig. 10), 난황단백전구체의 합성부위는 간체장이 규명되었다. 이러한 결과는 Paulus and Laufer(1987)의 보고와 Han(1988)의 보고와 같다. 계류에서 간체장이 난황단백전구체의 합성부위라는 보고는 이미 Wolin 등(1973)이 발표하였지만, 이들의 면역학적인 실험에서 간체장내에는 혈액성분이 남아있을 가능성이 있으며, 또한 흡수항체에 의한 면역반응만으로 합성장소의 同定에는 불충분한 점이

많다고 생각된다.

이제까지의 난황단백전구체의 합성부위에 대한 결과들로 부터 갑각류에서는 목(class)에 따라 다소 차이가 있고, 십각목내에서도 종에 따라 상이하게 나타남을 보여주고 있다. 그러나 아직 한정된 종에 대한 연구에 지나지 않아 갑각류에서 난황단백전구체의 합성부위에 대한 일반적인 경향에 대하여 언급하기에는 앞으로 더 많은 종에 대하여 합성부위의 구명이 있어야 하리라 생각한다.

요 약

동남참게, *Eriocheir japonicus*의 난황단백전구체 합성부위를 면역조직화학적 방법으로 구명하기 위하여, 난황단백질을 정제하고, 이 단백질에 대한 항혈청을 제작하여 난황단백질에 대한 면역학적인 성질을 밝힌 후, 난황단백전구체의 항체가 존재하는 항 난황단백혈청을 사용하여 PAP(Peroxidase-antiperoxidase)법으로 생식소, 간췌장, 근육조직을 대상으로 면역조직화학 반응을 시켰다.

성숙한 암, 수혈청에 대한 면역전기영동과 Ouchterlony 면역확산 실험에 의하여 암혈청내에는 암 특이성혈청단백질이 있음이 밝혀졌다. 암, 수혈청에 대한 항혈청과 난황형성중인 암혈청에 대한 조난황단백추출액에 대하여 면역전기영동과 Ouchterlony 면역확산 실험을 행한 결과, 암 특이성혈청 단백질은 난황단백전구체임이 밝혀졌다.

조난황단백추출액으로 부터 DEAE 이온교환 chromatography와 sepharose CL-4B gel 여과법에 의하여 난황단백질을 정제하였으며, 이 난황단백질의 분자량을 sepharose CL-4B gel 여과법에 의하여 추정된 결과 분자량은 약 245,000 dalton이었다. 또한 난황단백질은 면역학적인 분석에 의하여 난황단백질에 대한 항혈청에는 난황단백전구체에 대한 항체가 존재하고 있음이 증명되었다.

난황단백질에 대한 토끼 항혈청을 이용하여 PAP법에 의한 면역조직화학반응을 시킨 결과, 난황형성중인 난모세포와 성숙한 암참게의 간췌장은 양성반응이 나타내는데 반하여 난소내의 여포세포층과 난황형성전 난모세포, 근육층 그리고 성숙한 수참게의 간췌장은 전혀 양성반응이 나타나지 않았다. 따라서 본 종의 난황단백전구체의 합성부위는 간췌장임을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- Adiyodi, R. G. 1968. Protein metabolism in relation to reproduction and molting in the crab, *Paratelophusa hydriformis*: part II-Fate of conjugated proteins during vitellogenesis. Indian J. Exp. Biol. 6, 200~203.
- Beams, H. W. and R. Kessel. 1963. Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. J. Cell Biol. 18, 621~649.
- Besse, G. and J. P. Mocquard. 1968. Etude par electrophorese des quantites relative des proteines de l'hemolymphe d'individus normaux et de femelles castrées chez deux Crustacés Isopodes: *Porellio dilatatus* Brandt et *Ligia oceanica* L. C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D. 267, 2017~2019.
- Brookes, V. J. 1969. The induction of yolk protein synthesis in the fat body of on the insect, *Leucophaea madeeae*, by an analog of the juvenile hormone. Develop. Biol. 20, 459~471.
- Chen, T. T., P. Couble, P. Abu-Hakima and G. R. Wyatt. 1979. Juvenile hormone controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body. Develop. Biol. 69, 59~72.
- Chinzie, Y. and I. Yano. 1985. Fat body is site of vitellogenin synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubate*. J. Comp. Physiol. B. 155, 671~678.
- Davis, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404~427.
- Fretz, R. 1960. Contribution a l'etude biochemique du milieu interieur de *Carcinus maenas* L. Bull. Sod. Sci. Nancy, nlle series 19, 1~176.
- Fyhn, U. E. H. and J. D. Costlow. 1977. Histology and histochemistry of the ovary and oogenesis in *Balanus amphitrite* L. and *B. eburneus* Gould (Cirripedia, Crustacea). Biol. Bull. 152, 351~359.
- Hagedorn, H. H. and C. J. Judson. 1972. Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk protein. J. Exp. Zool. 182, 367~378.

- Han, C. H. 1988. Physiological studies on the reproductive cycle of a freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*(De Haan). Ph. D. Thesis, Faculty of agriculture, Univ. of Tokyo. pp. 53~62.
- Hinsch, G. W. and M. V. Cone. 1969. Ultrastructural observation of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. J. Cell Biol. 40, 336~342.
- Kerr, M. S. 1968. Protein synthesis by hemocytes of *Callinectes sapidus*: a study of *in vitro* incorporation of ¹⁴C-leucine. J. Cell Biol. 39, 72~73.
- Lui, C. W., B. A. Sage and J. D. O'Connor. 1974. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. J. Exp. Zool. 188, 289~296.
- Lui, C. W. and J. D. O'Connor. 1976. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. II. Characterization of and *in vitro* incorporation of amino acids into the purified subunits. J. Exp. Zool. 195, 41~52.
- Meusy, J. J., H. Charniaux-Cotton and Y. Croisille. 1969. Etude par electrophorese chez *Orchestia gammarella*(Pallas) et *Orchestia mediterranea* Costa(Crustaces Amphipodes) des proteines de l'hemolymph: comparaison entre les males, les femelles et les intersexues. C. R. Acad. Sci. Paris. Ser. D, 269, 741~743.
- Meusy, J. J., C. Zerbib, F. Dacheux and M. P. Dubois. 1983. Subcellular localization of vitellogenin in crustacean adipocytes by the unlabelled antibody enzyme method. Tissue Cell 15, 301~310.
- Nakagawa, H., A. Salam and S. Kasahara. 1982. Female-specific lipoprotein level in hemolymph during egg formation in freshwater shrimp. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 48, 1073~1080.
- Newbould, B. B. 1965. Production of allergic encephalomyelitis in rats by injection of spinalcord adjuvant into the inguinal lymph nodes. Immunol. 9, 613~614.
- Pan, M. L., W. J. Bell and W. H. Telfer. 1969. Vitellogenin blood protein synthesis by insect fat body. Science 165, 393~394.
- Picaud, J. L. 1980. Vitellogenin synthesis by the fat body of *Porellio dilatatus* Brandt(Crustacea, Isopoda). Int. Invert. Reprod. 2, 347~348.
- Paulus, J. E. and H. Laufer. 1987. Vitellogenocyte in the hepatopancreas of *Carcinus maenus* and *Libinia emarginata*(Decapoda Brachyura). Int. J. Invert. Reprod. Develop. 11, 29~44.
- Souty, C. and J. L. Picaud. 1981. Vitellogenin synthesis in the fat body of the marin crustacean isopoda, *Idotea balthica basteri*, during vitellogenesis. Reprod. Nutr. Develop. 21, 95~101.
- Sternberger, L. A., P. H. Jr. Hardy and J. J. Cuculis. 1970. The unlabelled antibody-enzyme of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex(horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. Reprod. Nutr. Develop. 21, 95~101.
- Wallace, R. A., S. L. Walker and P. V. Hauschka. 1967. Crustacean lipoprotein and charecterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of Decapoda. Biochemistry 6, 1582~1590.
- Wolin, E. M., H. Laufer and D. F. Albertini. 1973. Uptake of the yolk protein, lipovitellin, by developing crustacean oocyte. Develop. Biol. 35, 160~170.
- Yano, I. and Y. Chinzei. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. 86, 213~218.
- Zhai, Q. H., J. H. Postlethwait and J. W. Bodley. 1984. Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. Insect Biochem. 14, 299~305.

1992년 8월 8일 접수

1992년 9월 5일 수리