

한국산 멧누에나방(*Bombyx mandarina*)에 있어서 난각유전자의 형질발현 II. 난각단백질의 합성과정

Chorion Gene Expression in the Cellular Differentiation and Accumulation of
Chorion Protein Synthesis of Silkmoth, *Bombyx mandarina*(Lepidoptera: Bombycidae)

II. Synthesis Programme of Chorion Proteins

盧 時 甲

Noh Si Kab

ABSTRACT The programme of silkmoth chorion protein synthetic changes is autonomous; i. e., it is implemented with normal kinetics by follicles cultured in isolation in a defined tissue culture medium. On the basis of protein synthetic profiles, 8 stages of choriogenesis are defined. Detail analysis of the proteins of chorion of *Bombyx mandarina*, reveals more than 17 components by eletrophoretic mobility and synthetic kinetics. We have defined three abbreviated synthetic stages, based on the pattern of protein synthesized at early, middle, and late synthetic stages.

KEY WORDS Silkmoth (*Bombyx mandarina*), chorion gene, chorion protein synthesis

초 록 멧누에나방(*Bombyx mandarina*) 난각유전자의 형질발현기구를 규명하기 위한 연구의 일환으로 난각형성과정에 있어서 난각단백질의 합성과정을 분석하였다. 난각단백질의 합성과정을 여포세포의 기관배양에 의한 *in vitro* 합성체에 의하여 분석한 결과, 합성과정은 8단계로 나눌 수 있었으며 SDS-PAGE 분석에 의해 17개 이상의 단백질 band로 분리되었다. 멧누에 난각단백질은 합성시기에 따라 3단계로 구분되며 초기에는 비교적 고분자 성분이, 합성의 중후기에는 비교적 저분자성분이 합성되는 등 난각단백질의 합성은 시기특이적으로 조절되었다.

검 색 어 멧누에나방, 난각유전자, 난각단백질합성, 기관배양

멧누에나방(*Bombyx mandarina*)은 누에나방과(Bombycidae)에 속하는 견사충류의 일종으로 우리나라 전역에 분포하고 있다. 멧누에나방의 유충은 뽕나무만을 기주식물로 하는 단식성이며 여러가지 유전적인 형질면에서 볼 때 집누에나방의 유일한 선조형으로 인정되고 있다(川口 1923). 한편 멧누에는 집누에의 유전학 및 생리학연구의 비교대상으로 사용되는 것은 물론(吉武 1966, 小山 1975) 멧누에가 집누에의

선조형 혹은 야생형이라는 관점에서 멧누에와 집누에와의 관계규명을 위한 연구도 활발히 행해지고 있다. 즉 특정유전자를 지표로 하여 멧누에가 어떠한 변이과정을 거쳤으며 또한 집누에와의 유연관계에 대한 것 등이다(Maekawa et al. 1988).

대부분 나비목곤충들의 난각(알껍질)은 단백질이 95% 이상 함유된 특이적인 조직이며(Kawasaki 1971, 1972) 이들 난각단백질은 여포세

포로부터 분비된다. 즉 난각형성과정에서 난각 단백질이 합성 분비되며 이 물질이 난표면에 집적되고 일정형태로 구축되면서 각각의 특유한 난형과 난각구조가 형성된다(Margaritis 1985). 또한 이러한 일련의 과정에는 난각유전자(chorion gene)로 총칭되는 수종의 유전자가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(Regier 1985).

근년 집누에의 난각유전자 cloning되고 구조해석은 물론 세포내에서의 조절기구조까지도 밝혀지고 있으나(Eickbush & Kafatos 1982, Spoerel et al. 1989, Skeiky & Iatrou 1991) 나비목 곤충류 중 집누에를 제외하고는 이같은 연구는 거의 전무한 실정이다. 저자는 전보(盧 1990)에서 한국산 멧누에 난의 정상 및 난각의 부위특이적인 미세구조를 밝히는 한편 난각 단백질의 분석에 의해 집누에와의 유사성을 논한 바 있다. 따라서 멧누에난의 특이적인 난각구조와 난각단백질과의 관계 및 두 종간에 있어서 난각유전자의 발현기구, 나아가서는 유전자 cloning에 의한 유전자의 구조해석이나 유전자의 변이정도등을 규명하므로써 유전자의 형질발현기구는 물론 집누에와의 유연관계를 해명할 수 있는 중요한 자료가 될 수 있을 것이다(Kusuda et al. 1986, Fujiwara et al. 1987).

본 연구는 멧누에 난각유전자의 형질발현기구 규명을 위한 연구의 일환으로 난각형성과정에 있어서 난각단백질의 합성 및 분비과정을 밝히기 위하여 시도되었다.

재료 및 방법

시험재료 및 사육

본 실험에 사용된 멧누에나방 계통은 경북 달성지역 채집종으로 사육 및 난의 보호는 盧와 金(1991)의 방법에 준하였다.

여포세포의 배양 및 난각단백질의 *in vitro* 합성

용화 후 8일째의 멧누에나방 암번데기를 실험에 사용하였으며 난각단백질의 분비개시 위

치를 알기 위하여 0.1% trypan blue 수용액 100 μ 씩을 번데기의 복부에 주사하여 25°C에 3시간동안 보관하였다. 배양실험에 사용되는 모든 도구는 멸균소독하였으며 곤충조직배양액도 microfilter(0.22 μ m, Millipore Co.)로 여과시킨 후 사용하였다. 제액의 멜라닌화를 막기 위하여 소량의 phenylthiourea를 넣은 Grace's tissue culture medium(Grace 1962, Gibco Co.)에서 해부한 후 glycine이 함유되어 있지 않은 배양액에서 난소소관채로 25°C incubator에서 10분간 배양시켰다. 3 H-Glycine(20 Ci/mmol, 100 μ Ci/ml, Amersham)이 첨가된 0.4~0.5ml의 Grace's medium에 난관을 옮겨 30분간 배양한 후 complete Grace's medium에서 30분간 chase incubation하였다. *In vitro* 표식이 끝난 난은 난소소관 주위에 부착된 지방조직등을 완전히 제거한 후 순서대로 잘라서 -20°C 냉동고에 보관하였다가 분석에 사용하였다.

전기영동 및 Fluorography

분석에 사용할 난각을 시료용해액(8M urea, 0.05M tris-HCl(pH 9.0), 0.07M dithiothreitol, 1.5mM EDTA(Na), 1.5mM lysine)에 2~3시간 실온에서 용해시켰다. 난각이 완전히 용해된 후 시료액의 1/2 volume의 iodoacetamide(1.2M Tris-HCl)를 첨가하여 carboxamidomethylation을 시켰다(Paul et al. 1972).

이 시료액의 5~40배액의 SDS sample buffer(0.063M tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.143M 2-mercaptoethanol, 0.002% BPB)를 첨가하여 전기영동용 시료액으로 사용하였다.

전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 준하였으며 7M urea, 0.5% SDS를 함유한 10% acrylamide gel를 지지체로 한 SDS slab 전기영동을 하였다. 영동이 끝난 gel은 20% trichloroacetic acid에 30분간 고정하여 0.1% coomassie brilliant blue R250으로 염색했으며 7.5% acetic acid, 5% methanol용액으로 탈색하였다.

Fluorography는 Bonner(1984)의 방법에 준

하였으며 -80°C 의 초저온 냉동고에 3~10일간 Hyperfilm(Amersham)에 감광시킨 후 현상하였다.

결과 및 고찰

용화 8일째의 멧누에 암번데기를 해부하면 8줄의 난소소관이 있으며 난소소관 1줄에 30~40개의 난이 형성되어 있다. Trypan blue에 의한 생체염색(재료 및 방법)으로 난각단백질의 분비개시점을 식별할 수 있는데 즉 난각단백질이 분비되기 전의 난은 짙은 청색으로 염색되며 분비가 개시된 알은 연한 청색 혹은 하늘색을 띠게 된다. 특히 난각단백질의 분비가 시작된 알의 경우에는 난황부분은 거의 염색되지 않고 여포세포층만이 연하게 염색된 상태이므로 육안으로도 쉽게 난각단백질의 분비개시 위치를 식별할 수 있다. 이 시점에서 1줄의 난소소관에는 단백질의 분비가 개시된 난에서부터 분비가 완료된 난까지 20~30개 정도의 난이 관찰된다.

멧누에 난각단백질의 구성아미노산중에서 glycine이 전체의 40% 이상을 차지하므로(Kawasaki 1972) ^3H -glycine에 의해 표지된 단백질은 합성과정에 있어서 난각단백질의 질적 및 양적인 변화를 나타내는 지표로 볼 수 있다. 난각단백질의 합성 및 분비과정을 추적하기 위하여 방사성 동위원소 ^3H -glycine을 사용하여 여포세포의 *in vitro* 배양을 실시하였다. 합성된 난각 단백질은 SDS-PAGE 상의 상대적 이동도와 합성 kinetics에 의해 17개 이상의 단백질 band로 분리되었다. 이들 단백질은 분자량이 7,000에서 30,000d 사이에 대부분이 존재하였으며 표준단백질에 의한 분자량계산에 의해 3개의 군(A; 7-9.5kd, B; 10-14kd, C; 18-30kd)으로 구분되었으며(그림 2의 A, B, C), 또한 합성된 단백질성분의 질적 및 양적인 차이에 의해 발육과정을 stage를 I에서 VIII까지 8단계로 구분할 수 있었다.

그림 1에 각각의 단백질 band에 대한 합성

과정을 도식적으로 나타냈으며, 대체적으로 볼 때 A군은 합성의 증기부터 말기에 걸쳐서 대부분이 나타났으며 이들 성분 모두는 난각단백질의 주요 구성성분으로 존재하였다. 즉 10kd 이하의 비교적 저분자 단백질은 난각형성과정의 증후기에 합성 분비되며 이들은 난각구성의 주요성분으로 존재한다는 것을 알 수 있다. B군의 경우, 대부분의 성분은 증기부터 합성되기 시작하지만 성분 B3나 B6, B7등은 초기부터 말기까지 주요성분으로서 합성이 지속된다. 이와같은 사실은 성분 B3, B6, B7등은 난각단백질의 주요 구조단백질이며 난각형성에 있어서 가장 기본적인 성분으로 사용되고 있다는 것을 추측케 한다.

그러나 성분 B1, B2는 비교적 말기에 합성되면서도 주요성분으로 나타나 시기특이적으로 합성활성이 강한 것으로 나타났다. 한편 A군과 B군 성분들은 양적인 측면에서 볼 때 전체

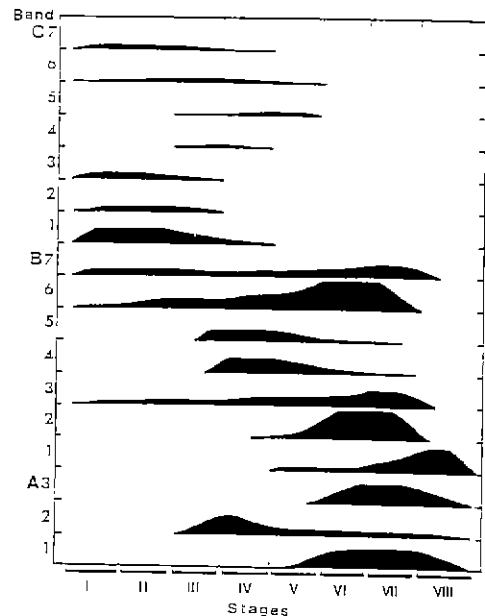


Fig. 1. Schematic diagram of chorion protein synthesis during follicular development. The kinetics of synthesis of individual protein bands resolved on SDS-PAGE gels were estimated from examination of more than 10 synthesis profiles. Optimal resolution of all the regions required comparison of many gels.

난각단백질의 90% 이상을 차지 하였다. 이와 같은 사실은 *Antheraea polyphemus*(Paul et al. 1972)나 집누에 난각단백질(Nadel 1977)과도 매우 유사하였다. C군의 경우 검출된 대부분의 성분은 비교적 합성초기에 분비되며 C1성분을 제외하고는 대부분이 미량성분으로 검출되었는데 이들 C군에 속하는 대부분의 성분들은 Regier(1982)가 주장한 대로 난각 내충의 형성이나 초기 framework에 사용되는 단백질로 추측된다.

Table 1. Synthetic period and maximal intensity of chorion of chorion proteins in *Bombyx mandarina*

Band	Intensity	Synthetic period
A 1	+++	V-VIII
2	+++	III-VIII
3	++++	VI-VIII
B 1	+++	V-VII
2	++++	IV-VII
3	+++	I-VII
4	+++	IV-VII
5	++	IV-VII
6	++++	I-VII
7	+++	I-VII
C 1	+++	I-IV
2	+	I-III
3	++	I-III
4	+	III-IV
5	+	III-V
6	+	I-V
7	+	I-IV
*v	++++	before choriogenesis

The indicated intensity of each band is based on staining with Coomassie brilliant blue and fluorograms. +; very minor, ++; minor, +++; major, ++++; very major. *; It may not be a chorion protein, instead a yolk or vitelline membrane protein

분비시기에 따른 난각단백질의 합성 양상을 그림 2에 나타냈다. 이것은 여포세포로부터 합성 분비된 난각단백질로 incorporation된 ^3H -glycine의 방사활성을 X선 필름상에 나타낸 것으로 band의 크기는 합성된 단백질의 상대적인 양을 나타내는 것이다. 사진의 가장 왼쪽

lane에 나타난 두개의 성분 Y는 난각단백질의 합성시기 및 합성된 난각단백질과의 유사성을 확인하기 위한 것으로 난각단백질 합성 전의 난세포질을 동일한 조건하에서 전기영동한 것이다. 이 성분은 난황단백질 혹은 난황막 단백질성분으로 생각되며 난각단백질의 합성이 개시되면 이 단백질성분의 합성은 거의 인정되지 않았다. 이같은 사실은 난각형성과정이 시작되면 난황단백질의 합성은 거의 무시해도 좋다고 한 Telfer(1965)나 Brennan(1982)의 결과와도 잘 일치한다.

그림 1과 2에 의해 난각단백질의 합성과정을 크게 3단계로 나눌 수 있는데 초기(stage I-II), 중기(stage III-V), 말기(stage VI-VIII)가 그것이다. 즉 성분 B3, B6, B7을 제외하고는 대부분의 성분들은 일정한 기간동안에만 합성된다고 여겨진다. Nadel(1977)에 의하면 집누에의 경우 난각단백질의 합성을 시기적으로 구분하여 early, early middle, middle, late의 4단계로 나누고 이들의 각각은 4개의 시기특이적인 난각유전자에 의해 조절된다고 하였다. 멧누에 난각단백질의 경우에도 시기적으로 크게 3단계에 합성시기를 나타내었는데 이와 같은 사실은 난각유전자가 난각형성과정에서 시기특이적인 활성에 의해 조절되는 것을 의미하는 것으로 생각된다.

한편 전보(盧 1990)의 난각단백질의 분석결과, 멧누에난각의 최외층 구조인 덮개구조층은 등전점이 pI 6에 가까운 성분들로서 집누에 난각단백질과의 질적인 차이를 나타내는 성분들로 생각할 수 있다. 또한 덮개구조층의 형성이 난각형성과정의 중기이후에 일어나는 것을 감안할 때(미발표) 멧누에 난각단백질의 합성과 분비가 시기특이적인 조절에 의하며 이것은 난각구조의 형성과정과도 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

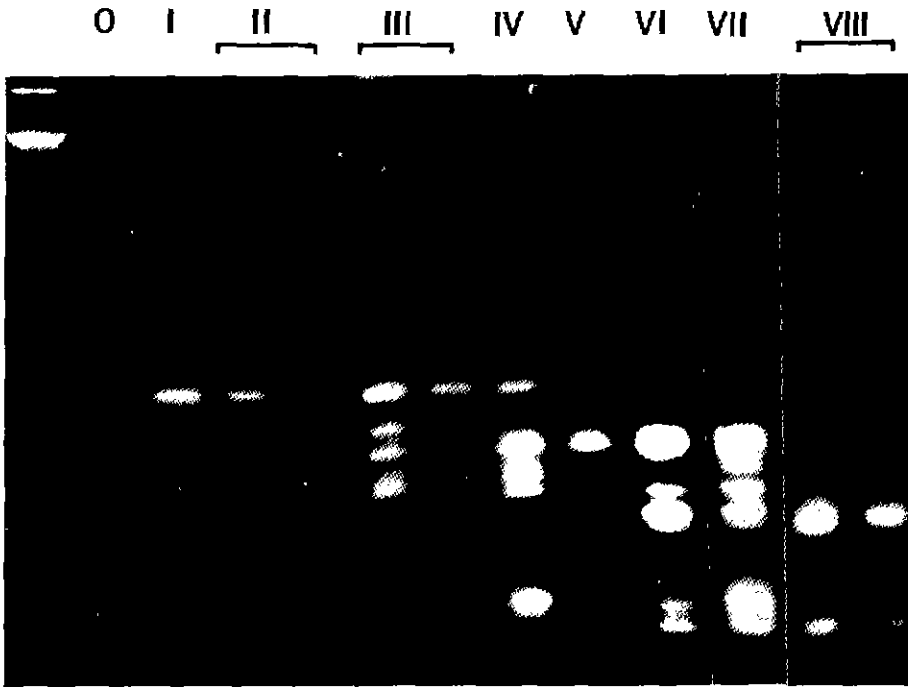


Fig. 2. The changing pattern of chorion protein synthesis during follicular development. For each experiment, a series of follicles from a single ovariole were labeled, and electrophoresed on SDS-PAGE as described under materials and methods. Newly synthesized proteins were detected by fluorography. Roman numerals at the top indicate the abbreviated synthetic stages.

사 사

본 논문은 학술진흥재단 학술연구조성비에 의한 연구의 일부 임.

인 용 문 헌

- Bonner, W. M. 1984. Fluorography for the detection of radioactivity in gels. *Meth. Enzymol.* 104: 460~466.
- Brennan, M. D., A. J. Werner., T. J. Goralski & A. P. Mahowald. 1982. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in dipteran eggs. *Develop. Biol.* 89: 225~236.
- Eickbush, T. H. & F. C. Kafatos. 1982. A walk in the chorion locus of *Bombyx mori*. *Cell* 29: 633~643.
- Fujiwara, H., H. Maekawa., O. Ninaki., N. Takada., N. Miyajima & H. Ishikawa. 1987. Comparative studies on the rDNA of the silkworm, *Bombyx mori* and its presumed ancestor. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 761~766.
- Grace, T. D. C. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissue grown *in vitro*. *Nature* 195: 788~789.
- 川口榮作. 1923. 細胞學的見地に立ちて桑蠶より家蠶への推移を論ず. *蠶業新報* 31: 159~165.
- Kawasaki, H., H. Sato & M. Suzuki. 1971. Structural proteins in the silkworm egg-shells. *Insect Biochem.* 1: 130~148.
- Kawasaki, H., H. Sato & M. Suzuki. 1972. Structural proteins in the egg-shell of silkworm, *Bombyx mandarina* and *Antheraea mylita*. *Insect Biochem.* 2: 53~57.
- 小山長雄・宮田渡. 1975. カイコガの後頭部形態. *日蠶雑* 44: 55~60.
- Kusuda, J., Y. Tajima., K. Onmaru., O. Ninaki & Y. Suzuki. 1986. The sequence around the 5' end of the fibroin gene from the wild silkworm, *Bombyx mandarina* and comparison with that of the domesticated species, *Bombyx mori*. *Mol. Gen.*

- Genet. 203: 680~685.
- Maekawa, H., N. Takada., K. Mikitani., T. Ogura., N. Fujiwara., M. Kobayashi & O. Ninaki. 1988. Nucleolus organizers in the wild silkworm *Bombyx mandarina* and the domesticated silkworm *Bombyx mori*. Chromosoma 96: 263~269.
- Margaritis, L. H. 1985. Structure and physiology of the egg-shell in 'Comprehensive Insect Physiology Biochem. and Pharmacology' Pergamon press. Oxford. vol. 1: 153~230.
- Nadel, M. R. 1977. Analysis of chorion mutants of *Bombyx mori*. Ph. D. thesis. Harvard Univ.
- 盧時甲. 1990. 한국산 뽕누에(*Bombyx mandarina*)에 있어서 卵殼遺傳子의 形質發現. I 卵殼構造의 特異성과 chorion蛋白質. 韓應昆誌. 29: 157~164.
- 盧時甲·金鐘吉. 1992. 한국산 뽕누에나방(*Bombyx mandarina*)의 室內飼育. 韓應昆誌. 31: 33~36.
- Paul, M., M. R. Goldsmith., J. R. Hunsley & F. C. Kafatos. 1972. Cellular differentiation and specific protein synthesis: production of egg shell proteins by silkworm follicular cells. J. Cell. Biol. 55: 653~680.
- Regier, J. C., G. D. Mazur., F. C. Kafatos & M. Paul. 1982. Morphogenesis of silkworm chorion: initial framework formation and its relation to synthesis of specific proteins. Dev. Biol. 92: 159~174.
- Skeiky, A., W. Yasir & K. Iatrou. 1991. Synergistic interactions of silkworm chorion promotor-binding factors. Mol. Cell Biol. 11: 1954~1964.
- Spoerel, N., H. T. Nguyen., T. H. Eickbush & F. C. Kafatos. 1989. Gene evolution and regulation in the chorion complex of *Bombyx mori*. J. Mol. Biol. 209: 1~19.
- Telfer, W. H. 1965. The mechanism and control of yolk formation. Ann. Rev. Entomol. 10: 161~184.
- 吉武成美, 1966. 種種の酵素型からみたクワコとカイコの類縁關係について. 遺傳雜, 41: 259~267. (1993년 8월 6일 접수)