

홍모기(*Culex pipiens pallens*)의 난성숙 과정중 Superoxide dismutase의 활성화

임태진 · 이승훈 · 박영민 · 김인규 · 성기창

성균관대학교 생물학과

*Culex pipiens pallens*에 존재하는 superoxide dismutase의 연구를 위한 적정 분석 조건과 우화 전후, 시간 경과에 따른 superoxide dismutase 활성화 경향에 대해서 연구하였다. *C. pipiens*에 존재하는 superoxide dismutase의 활성화는 부화 직후부터 지속적으로 감소하다가, 우화 후 흡혈 자극에 의해서 급격하게 증가한다. 흡혈 후 36시간이 경과했을 때, 최대의 활성도를 보인 후 급격히 감소하였다. 기관별 분석에서 흡혈 후 가장 높은 활성 증가는 중장에서 일어나고, 머리, 흉부, 지방체 및 난소에서도 활성의 증가가 나타났다. 흡혈 전에는 2개의 동위효소(SOD-1, SOD-2)가 존재하였으나, 흡혈 후 36시간된 성체에서는 3개의 동위효소 밴드가 보이는데, 머리에서는 SOD-1만이 나타나고, 가슴에서는 SOD-2, 지방체와 난소에서는 SOD-1과 SOD-2이 존재하였고, 중장에서는 SOD-3가 나타났다. 그러므로 흡혈 후 나타나는 새로운 동위효소는 중장에서 합성됨을 알 수 있다.

KEY WORDS: Superoxide dismutase, midgut

Superoxide dismutase(SOD)에 대한 구체적 연구는 McCord와 Fridovich(1969)에 의해 시작되며, 그 후 생리적 특성, 분자적 구조에 대하여 활발히 연구되어지고 있다. SOD는 glutathionine peroxidase, catalase, glutathionine-S-transferase등과 함께 산소독성을 제거하는 효소이다. 산소독성은 O_2 환원 과정에서 나타난 superoxide radical, hydroperoxyl radical, hydroxyl radical과 관련되어 나타나며(Hassen and Fridovich, 1980). 그중 superoxide radical은 가장 활성화된 형태로 불포화 지방산, cholesterol등에 과산화 반응을 일으켜 암, 노화, 세포의 사망(cell death)등을 유발시키는 독성을 나타낸다(Cerruti, 1985). SOD는 이러한 독성의 방어 기작으로 발생기 산소를 화학적으로 제거하는 metalloenzyme이다(Bird *et al.*, 1986). Superoxide radical에 대한 독성 중 지질에 대한 독성은 곤충에 있어 대단히 치명적이다. 왜냐하면 cholesterol과 같은 지질은 막의 성분이며,

ecdysteroid 계통 호르몬의 전구체 역할을 하는 등 생리적 기능에 절대적으로 필요하기 때문이다. 특히 cuticular lipid는 desiccation을 억제한다는 점에서 다른 생물체보다 곤충에서 그 중요성이 크며 그밖의 다른 lipid는 유충호르몬과 pheromone의 전구체 역할을 하기 때문이다(Downer, 1986).

Lee 등(1981)은 *Drosophila melanogaster*의 SOD를 분리하여 그 활성을 조사한 결과 포유류에 비하여 그 활성이 1.5배 이상 높다는 사실을 밝혀냈다. 이 사실은 ionization radiation의 cytotoxic effect에 대해 다른 어떤 동물보다도 곤충이 강한 저항성을 보인다(Casarett, 1968)는 사실과 결부되어 곤충에서의 SOD에 대한 연구가 활발히 진행되는 계기를 만들었다. 최근 Ahmed 등(1991)은 Cabbage looper인 *Trichoplusia ni* 유충에서 각 기관별 SOD 활성을 조사한 결과, 주로 말피기관, 근육, 중장, 표피등이 높은 활성을 갖는다고 보고하였다. 이때 장기관에서 높은 활성이 나타난 이

유는 소화과정중 나타난 생체외부에서의 pro-oxidant에 대한 방어기작을 수행하기 위한 것이고, 표피에서의 활성은 빛에 의한 산소독성을 줄이기 위한 것이며, 대사활성이 높은 기관에서 나타나는 것은 대사과정중에 발생하는 superoxide radical을 제거하기 위한 것이다(Pritos et al., 1990; Ahmed et al., 1987, 1990). Laloraya와 Kumar(1990)는 *Rattus norvegicus*에서 생리주기동안 superoxide radical과 superoxide dismutase의 농도가 증가하며 이러한 변화양상은 생리주기에 있어 황체의 steroid 합성과정을 조절하는 것으로 보고하였다. 최근 연구의 초점은 SOD의 활성을 저해하는 화학적 물질에 대한 연구로 Pritos 등(1991)은 *Trichoplusia ni*, *Spoloptera*, *Papilio polyxenes*에서 Quercetin에 대한 SOD의 영향에 대해 보고하였고, Kagan 등(1984)은 모기 *Aedes aegypti*에서 α -Terthienyl이 SOD의 활성을 저해한다고 보고하였다. 많은 곤충에 있어서 SOD에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나, 모기에 있어서는 거의 연구결과가 없는 실정이다. 그러나 모기에 있어서 SOD의 활성은 다른 곤충들에서의 결과로 미루어 보아 대사활성이 활발할 때 증가하며, 특히 흡혈한 후의 난성숙과정에서 중장이나 활성화된 난소에서 그 기능을 수행할 것으로 추측된다. 따라서 모기의 생식생리를 이해하는데 있어서 단백질의 합성 및 그 조절기작에 대한 연구뿐만 아니라 그 합성과정 및 운반등 난성숙과정에서 불가피하게 발생하는 superoxide radical에 대한 방어기작을 연구하는 것도 중요한 연구과제일 것으로 사료되어 본 연구에서는 흡혈을 하여야만 알을 만들 수 있는 모기에 있어 흡혈 후의 난성숙과정동안 일어나는 SOD의 활성조사와 생화학적 특성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

모기의 사육조건

홍모기(*Culex pipiens pallens*)는 한국 국립

보건원에서 분양 받아, 'Manual for Mosquito and Experimental Technique' (American Mosquito Control Association Inc.)에 기술된 사육 방법에 따라 항온($27 \pm 1^\circ\text{C}$), 항습($70 \pm 5\%$), 명암(16시간: 8시간)이 조절되는 항온 항습실에서 사육 하였다. 유충시기에는 bovine liver powder 수용액(10% w/v)을, 성체는 설당물(10%, w/v)과 물을 숨에 적서 먹이로 공급 하였다. 우화 후 3-5일 지난 모기는 실험용 흰쥐를 이용하여 흡혈 시켰다.

SOD의 추출 및 활성도 측정

SOD의 추출을 위하여 암모기 한마리당 20ul의 0.067M potassium phosphate buffer, pH 7.8을 넣고 4°C 하에서 glass homogenizer를 이용하여 파쇄한 후 Eppendorf microcentrifuge를 사용하여 16,000g로 15분간 원심분리하였으며 상등액을 취하여 효소시료로 사용하였다. SOD 활성의 측정은 Weisiger 등(1973)의 방법에 따라 NBT(nitroblue tetrazolium)을 사용하여 560nm 에서 1분당 흡광도의 변화량을 측정하는 방법으로 조사하였다. 효소의 1unit는 25°C 에서 표준시료내의 NBT를 50% 환원시키는 효소의 양으로 정의하고 specific activity는 다음 식으로 부터 계산 하였다.

$$\text{unit/mg protein} = 1000/\mu\text{g enzyme resulting in 50\% inhibition}$$

반응혼합액은 2.6ml의 0.067M potassium phosphate, pH 7.8과 0.2ml의 0.1M EDTA containing 0.3mM sodium cyanide, 0.1ml의 1.5mM NBT, 0.05ml의 0.12mM riboflavin과 0.05ml의 효소추출액을 포함하였다. 효소가 포함되어 있지 않은 표준시료와 적당한 농도로 희석된 효소추출물을 포함한 반응혼합액을 25°C light box에서 10분간 incubation 한 후 흡광도 변화량을 spectrophotometer(Shimadzu UV-240)를 이용하여 20분간 측정하였다.

전기영동 및 효소의 특이염색

전기영동은 Davis(1964)의 non-dissociating discontinuous buffer system을 사용하였다. 전기영동후 SOD의 염색은 Beauchamp and Fridovoch(1971)의 방법에 따라 실시하였다. 전기영동한 gel은 2.45mM NBT 용액에 20분간 담가둔 다음 0.028M TEMED, 0.028mM riboflavin, 0.036M potassium phosphate, pH 7.8가 함유된 용액에 형광등을 15분간 쬐어 주면서 염색을 실시하였다.

결과

Superoxide dismutase의 활성도 측정조건

SOD의 활성도 측정에 대한 최적조건들을 조사하였다. 적정 pH를 조사한 결과 pH 5.5-6.5에서는 거의 활성을 나타내지 않았고, pH 7.0 이상에서 급격히 증가하기 시작하여 pH 7.7에서 가장 높은 활성을 보인 후 pH의 증가에 따라 급격히 감소하여 pH 8.5 이상에서는 활성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

정확한 활성도 측정을 위해 EDTA, cyanide의 농도를 조절하여 그에 대한 SOD의 활성을 조사한 결과 EDNH의 최적농도는 0.1M 이었으며 sodium cyanide의 최적농도는 0.3mM 인 것으로 나타났다(Fig. 2, 3).

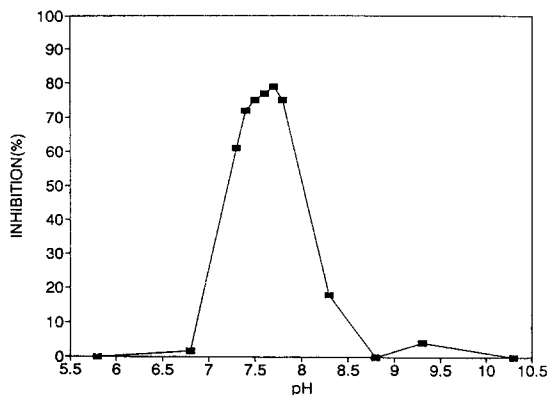


Fig. 1. The effect of various pH on SOD activity. pH regulated by addition of 0.1 N NaOH solution.

보족인자로 SOD가 함유하고 있는 copper와 zinc에 대한 영향을 조사한 결과, copper 이온은 농도가 50mM 일때 가장 높은 활성을 보였으며, 일반적으로 cupric chloride가 첨가되지 않았을 경우에 비하여 첨가해준 경우가 높은 활성을 나타내고 있다(Fig. 4). Zinc 이온의 경우는 zinc chloride의 농도변화에 따라 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 5).

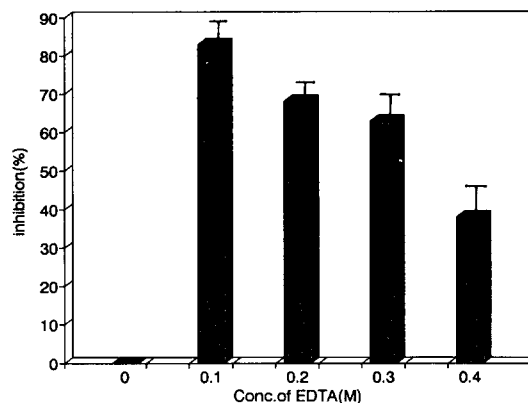


Fig. 2. The effect of various EDTA concentration on superoxide dismutase activity. Vertical line in each point indicates the standard deviation.

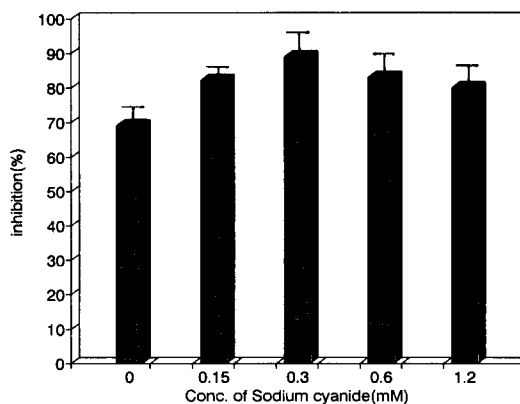


Fig. 3. The effect of various sodium cyanide concentration on superoxide dismutase activity. Vertical line in each point indicates the standard deviation.

발생시기 및 흡혈 후 시간 경과에 따른 SOD 활성의 변화

상기의 조건에 따라 발생시기별, 그리고 흡혈 후 시간의 경과에 따른 SOD의 활성도의 변화를 측정하였다. 그 결과 유충시기에서 성충이 되는 과정에서는 SOD의 활성도가 계속 감소하다가 성충이 흡혈을 한 후부터 급격히 증가하기 시작하여 흡혈 후 36시간에 가장 높은 활성을 보인 후 급격히 감소하여 48시간 이후에는 흡혈 전의 상태와 동일하게 거의 활성이 없는 것으로 나타

났다(Fig. 6).

흡혈 전과 SOD의 활성이 가장 높은, 흡혈 후 36시간 경과한 암모기 각 기관들에 대한 SOD의 활성도를 측정하였다(Fig. 7, 8). 그 결과 활성이 거의 나타나지 않는 흡혈 전에는 흉부와 머리에서 대부분의 활성이 나타났으나, 흡혈 후 36시간이 경과하였을 때는 중장에서 전체 활성의 40% 정도로 가장 높은 활성을 보였다. 그리고 기관별 활성의 변화를 보면 중장에서는 흡혈전 대비 20배정도의 활성도 증가가 나타났고, 지방체와 난소는 13배, 흉부와 머리에서는 약 3-4배의 활성도 증가를 보였다.

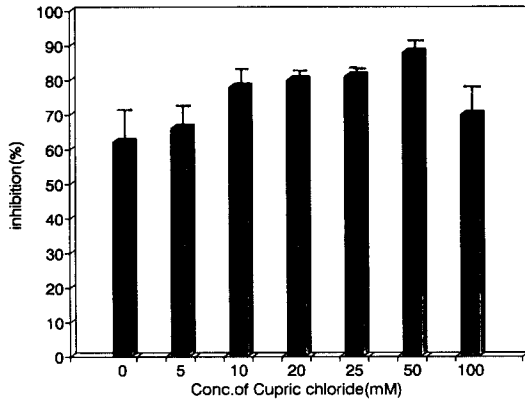


Fig. 4. The effect of various cupric chloride concentration on superoxide dismutase activity. Vertical line in each point indicates the standard deviation.

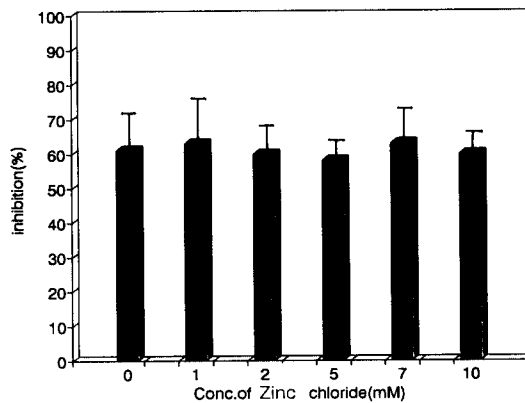


Fig. 5. The Effect of various Zinc chloride concentration on superoxide dismutase activity. Vertical line in each point indicates the standard deviation.

조직별 SOD 동위효소의 분포 및 종류

흡혈 후 SOD의 활성도의 증가가 기존에 있던 효소의 양적증가의 결과인지 아니면 또다른 동위원소가 새로이 생성된 결과인지를 알아보기 위하여 기관별 추출물을 전기영동한 후 효소 특이 염색법을 실시하였다. 그 결과 흡혈 전에는 2종류의 SOD(SOD-1, SOD-2)가 존재하였고, 흡혈 후 머리에서는 SOD-1만이 존재한 반면, 그외 모든 기관에서 SOD-1, 2가 나타났으며 그중 흉부에서 특히 많은 SOD-2가 존재하였다. 그리고 특이하게 중장에서는 동위효소 SOD-3가 새로이 나타났다(Fig. 8).

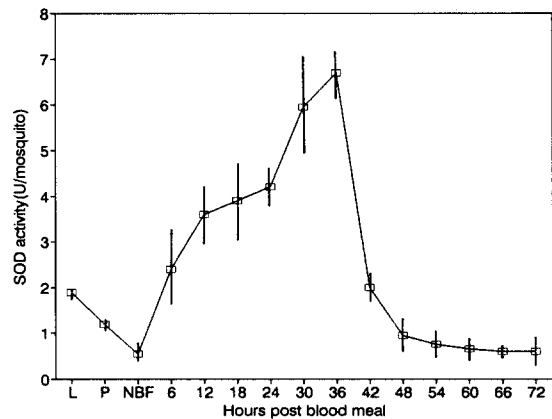


Fig. 6. Superoxide dismutase activity titer in *Culex pipiens* whole body extract at various times after blood feeding. L: larvae, P: pupae, NBF: non-blood feeding female. Vertical line in each point indicates the standard deviation.

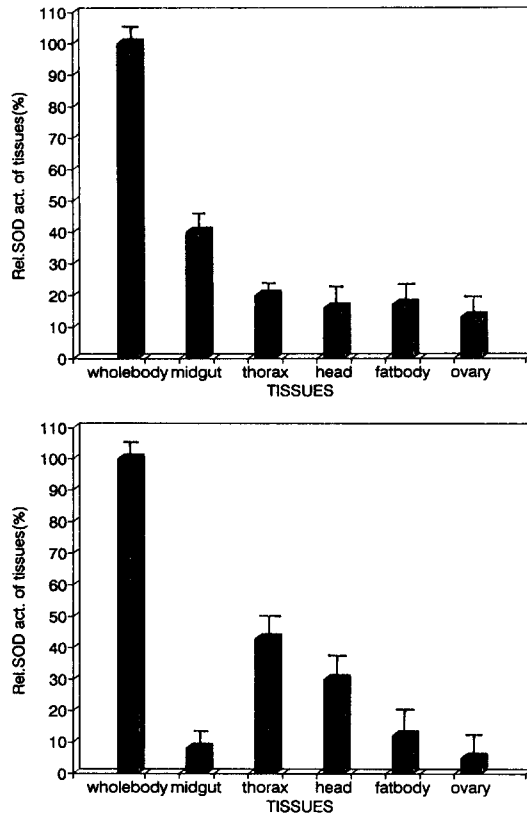


Fig. 7. Relative activities of SOD in various tissues of 36 hours after blood meal (above panel) and NBF (below panel). Vertical line indicates standard deviation.

고찰

SOD가 보족인자로 갖고 있는 copper와 zinc에 있어 일반적으로 연구된 결과는 copper가 활성에 절대적인 영향을 주며 효소의 안정성에도 크게 기여하나, zinc는 단순한 구조적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, Weisiger and Fridovoch(1973)에 의하면 보족인자가 없는 apoenzyme은 열에 매우 불안정하여 활성이 감소되며, copper 이온을 첨가해 주었을 때 다시 안정성과 활성을 회복하며, 또한 Cu, Zn 이온이 trypsin, chymotrypsin에 대해 영향을 받지 않게 하고 빛에 민감한 산화반응에도 저항성을 갖게 한다는 보고(Galiazzo *et al.*, 1986)

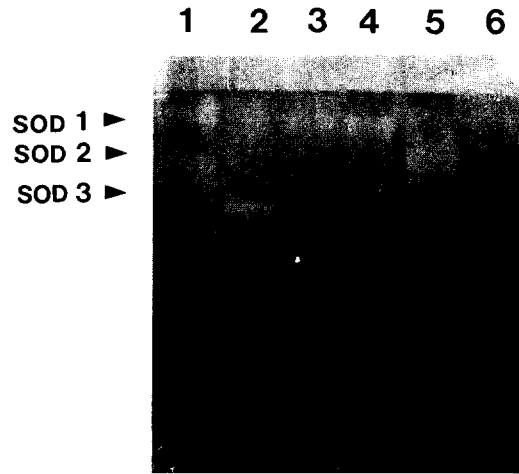


Fig. 8. Nonblood fed and blood fed *Culex pipiens* Superoxide dismutase was electrophoresed by native-PAGE. And the gel applide negative staining method(see material and method). 1-NBF whole body, 2-BF midgut, 3-BF ovary, 4-BF fat body, 5-BF thorax, 6-BF head.

도 있다. 본 실험의 결과 copper 이온이 존재치 않을 때에 비하여 50mM 첨가하였을 때 훨씬 높은 SOD 활성을 나타내었으며(Fig. 4), zinc 이온은 별 영향을 나타내지 않은 결과(Fig. 5)와 상기 보고된 내용을 종합해 보면 효소활성에 있어서 Cu 이온이 생화학적인 촉매작용에 관여하며 효소의 안정성에도 기여한다고 추정된다. 또한 SOD는 강력하게 결합할 수 있는 Cu, Zn 이온의 결합부위가 존재하고 apoenzyme의 형태에서 이들 이온이 존재하면 높은 친화력을 갖는 형태로 변화하며, 이온이 결합되면 효소의 활성화 에너지와 그 전체적인 구조가 변하여 높은 활성과 안정성을 갖게되는 것으로 추정된다.

발생시기별, 그리고 흡혈 후 시간의 경과에 따른 SOD 활성도의 변화를 조사한 결과(Fig. 6)에서 부화시기부터 성체가 될 때까지 그 활성이 감소하였으며 흡혈 후 부터 급격히 증가하기 시작하여 36시간때에 가장 높은 활성을 보인 이후 급격히 감소하여 흡혈 후 48시간에는 거의 활성이 없어졌다. 이 사실은 홍모기에 있어 난황단백질 합성을 최초로 자극하는 Egg Development Neurosecretory Hormone(EDNH)이 흡혈 직후에 방출되며(Kang and Lee, 1986), 난황

단백질의 합성이 흡혈 후 18-24시간에 가장 왕성하게 일어난 후 48시간 이내에 합성이 완료된다(Lee *et al.*, 1993)는 보고와 관련되어 단백질의 합성이 가장 왕성할 때 SOD의 활성도가 증가됨을 추측케하며 이는 Ahmed 등(1991)의 보고에서 뒷받침될 수 있다.

흡혈 전, 후의 기관별 활성을 조사하였을 때 중장의 경우 흡혈전에 비하여 흡혈 후에 약 20배 정도나 증가하였고 전체 활성의 약 40% 이상을 차지하였다(Fig. 7, 8). 이 결과는 최근 Ahmed 등(1991)이 *Trichoplusia ni*에서 각 기관별로 SOD의 활성을 조사한 결과 중장과 표피에서 높은 활성을 갖는다는 보고와 일치한다.

흡혈 전, 후에 나타나는 SOD 동위효소의 변화를 알아보기 위하여 조직별 추출물을 전기영동한 결과, 흡혈 전에는 2종류의 SOD(SOD-1, SOD-2)가 존재하였고, 흡혈 후 머리에서는 SOD-1만이 존재한 반면, 그외 모든 기관에서 SOD-1, 2가 나타났으며 그중 흉부에서 특히 많은 SOD-2가 존재하였다. 그리고 특이하게 중장에서는 동위효소 SOD-3가 새로이 나타났다(Fig. 8). 이 사실에서 흡혈 후 중장에서 SOD 활성도가 가장 높게 나타나는 이유는 새로운 동위효소인 SOD-3가 생성되기 때문이며, 다른 기관에서의 활성도 증가는 원래 존재하였던 SOD-1, 2의 양적증가에 의한 것이라고 추정된다. 또한 머리에서는 SOD-1만이 나타나며, SOD-2는 흉부에서 가장 많이 존재하고, 지방체와 난소에서는 SOD-1에 비하여 SOD-2가 다량 존재하였으며, SOD-3는 중장에서만 나타난다는 결과에서 Pritos and Ahmed(1990)의 보고서와 같이 어느 정도의 조직특이성이 있다고 하겠다.

Lee 등(1981)은 곤충에 있어 특히 높은 활성을 나타내는 SOD가 ionizing radiation에 높은 저항성을 보이는 근본적인 원인이 된다고 발표하였고, Laloraya와 Kumar(1990)는 *Rattus norvegicus*에서 생리기간 동안 superoxide radical과 SOD의 농도가 증가한다고 보고하였다. 흡혈한 *C. pipiens pallens* 암모기에 있어 SOD 활성에 대한 본 연구의 결과

들에서 SOD 활성의 변화가 흡혈 후 시작되는 난황단백질 합성의 양상과 거의 유사한 경향을 보였으며, 특히 난황단백질 합성에 영양을 제공하는 피가 저장되고 소화되는 중장에서 가장 높은 SOD의 활성과 새로운 SOD-3가 나타났다는 점에서 SOD는 암모기의 난황단백질 합성을 위해 중장에서 피가 소화되는 과정에서 증가되는 산소독성을 제거하는 역할을 수행함으로써 난황단백질의 합성을 돕는 것으로 생각된다. 현재까지 모기에 있어서 SOD에 대한 보고는 α -Terthienyl이 SOD의 활성을 저해한다는 보고(Kagan *et al.*, 1984)가 있을 뿐 그 연구가 대단히 미비한 상태이다. 앞으로 모기에 있어 나타나는 SOD에 대한 분리와 그 특성에 대한 연구가 계속 진행되면 모기에서 뿐만 아니라 전반적인 SOD의 기능을 이해하는데 많은 기여를 할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Ahmed, S., L.D. Dawin, C.W. Leanne and S.P. Ronald, 1991. Cabbage Lopper antioxidant enzyme: tissue specificity. *Ins. Biochem.* 21, No 5, 563-572.
- Ahmed, S., C.A. Pritos, S.M. Bowen, K.E. KirKland, G.J. Blomquist and R.S. Pardini, 1987. Activities of enzymes that detoxify superoxide anion and related oxiradical in *Trichoplusia ni*. *Archs. insect Biochem. Physiol.* 6, 85-96.
- Beauchamp, C.O. and I. Fridovich, 1971. Assays of superoxide dismutase. *Methods in Enzymol.* 105, 88-104.
- Bird, T.G., M.L. Salin, A. Boyle and J.R. Heitz, 1986. Superoxide dismutase in housefly, *Musca domestica* (L.). *Archs. Ins. Biochem. Physiol.* 3, 31-43.
- Cassarett, A.P., 1968. Radiation biology, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ. Chap. 10, p. 219.
- Cerruti, P.A., 1985. Prooxidant state and tumor promotion. *Science*, 227, 375-381.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-436.
- Downer, R.G.H., 1986. Lipid metabolism. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology.* 10, 105-114.
- Galiazzo, C.C., M. Civitareale and R. Marmocchi, 1991. Activation and induction by copper of Cu/Zn

- superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 196, 545-549.
- Hassen, H.M. and I. Fridovoch, 1980. Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, Inc., New York. Chap. 15, p. 312-332.
- Kagan, J., M. Hasson, F. Grynspan, 1984. The inactivation of acetylcholin-esterase by α -terthienyl and ultraviolet light studies *in vitro* and in larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Biochem. Biophys. Acta. 102, 442-452.
- Lee, Y.M., F.J. Ayla and H.P. Misra, 1981. Purification and properties of superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 256, 8506-8509.
- McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. J. Biol. Chem. 244(2), 6056-6063.
- Pritosos, C.A., J. Pastore and R.S. Pardini, 1991. Role of superoxide dismutase in the protection and tolerance to the prooxidant allelochemical quercetin in *papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania* and *Trichoplusia ni*. Archs. Ins. Biochem. Physiol. 16, 273-282.
- Pritosos, C.A., S. Ahmed, A.J. Elliott and R.S. Pardini, 1990. Antioxidant enzyme level response to prooxidant allelochemicals in larvae of the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. Free Ran. Res. Commun. 9, 127-133.
- Weisiger, R.A. and I. Fridovoch, 1973. Superoxide dismutase. Organelle specificity. J. biol. Chem. 248, 3582-3592.
- 강석희, 이승훈, 1986. Ovarian development in the mosquito, *Culex pipiens pallens*. 성균논집. 37(2), 171-180.
- 이승훈, 박영민, 성기창, 1993. Ovarian and fat body yolk protein synthesis in *Culex pipiens pallens*. Korean J. Zool. 36(3), 416-424.

(Accepted June 29, 1994)

Activity of Superoxide Dismutase from the Mosquito, *Culex pipiens pallens*

Lim, Tae-jin; Lee, Seung-Hoon; Park, Young-Min; Kim, in-Kyu; Sung, Kee-Chang (Department of Biology, College of Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea)

Superoxide dismutase from *Culex pipiens pallens* was examined to determine the optimal assay condition and to assay the activity during ovarian development.

The activity of alkaline phosphatase in a nongravid female were declined continuously after eclosion. But by the stimulus of a blood meal after adult eclosion, the enzyme activity was increased dramatically. At 36 hr. after blood meal, the maximal activity was reached and then declined. When the activity in several organs was estimated after blood meal, it increased to maximum in midgut, and moderately in head, thorax, fat body and ovary. Two isozymes (SOD-1, SOD-2) were shown before blood meal, but three isozymes were shown at 36 hr. after blood meal. Head contained SOD-1, thorax contained SOD-2, fat body and ovary contained SOD-1 and SOD-2, especially SOD-3 was shown in mid gut. These results suggest that newly occurred isozyme, SOD-3, synthesized in midgut.