

인시목 곤충의 성충체액 단백질에 관한 생리·생화학적 연구

III. 가잠의 성충체액 주단백질의 *in vivo* 및 *in vitro* 합성

이상몽 · 성수일* · 문재유** · 강현아***

농촌진흥청 시험국, *수원대학교 이과대학,

서울대학교 농업생명과학대학, *농촌진흥청 잠업시험장

Physiological and Biochemical Studies on the Adult Haemolymph Protein in Lepidoptera.

III. *In vivo* and *In vitro* Synthesis of Adult Major Haemolymph Protein in the Silkworm, *Bombyx mori*.

Sang Mong Lee, Su Il Seong*, Jae Yu Moon** and Hyun Ah Kang***

Research Bureau, R.D.A., Suwon, Korea

*College of Natural Science, The University of Suwon, Korea

**College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea.

***Sericultural Experiment Station, R.D.A., Suwon, Korea

Abstract

By *in vivo* labelling of AMHP using [³⁵S]-methionine, fat body culture and immunological analysis, it is proved that *Bombyx* adult fat body synthesizes 18K and 20K subunits of AMHP and releases them into haemolymph. Also these peptides are assembled to form native AMHP in the adult haemolymph.

Key words : *Bombyx* adult fat body, native AMHP, adult haemolymph.

서 론

누에에 있어서 몇몇 체액단백질들은 특정한 발육 시기에 합성되어 그 생리적 기능을 수행하고 있으며 그 대표적인 단백질로는 저장단백질(Pan *et al.*, 1969; Price, 1973; Tojo *et al.*, 1978, 1980), vitellogenin (Telfer, 1954; Ono *et al.*, 1975; Wyatt & Pan, 1978), MHPs(Major hemolymph protein; Seong *et al.*, 1985; 成, 1986; 成 등, 1988), 30K 단백질(Gamo, 1978; Izumi *et al.*, 1981), ESP(Egg specific protein; Yamashita, 1986) 및 lipophorin(Van der Horst *et al.*, 1981; Van der Horst *et al.*, 1990; Ryan, 1990; 茅野, 1987, 1993) 등이 보고되고 있다.

이상과 같은 누에의 주요 체액단백질의 대부분은

이미 분리·정제되어 그의 분자적 특성, 합성경로 및 생리적 기능 등이 상세하게 밝혀졌을 뿐만 아니라 30K 단백질, vitellogenin, ESP 등 일부의 단백질은 유전자의 클로닝과 함께 유전자구조는 물론 이들 단백질의 발현기구해석에 관한 연구가 진행되고 있다. (Izumi and Tomino, 1983; Inagaki *et al.*, 1987; Mounier and Coulon, 1991; Sato and Yamashita, 1989; Sato & Yamashita, 1991). 한편 저자들은 누에의 우화와 함께 나방의 체액에서 다량으로 검출되는 성충체액 주단백질 (Adult Major Haemolymph Protein; AMHP)에 주목하여 이 단백질의 유전적 변이성 및 물리화학적 성상 등에 대하여 보고한 바 있다(成 등, 1988; 李 등, 1992).

본 연구에서는 AMHP의 생리적 기능을 구명하기

위한 연구의 하나로 *in vivo* 및 *in vitro*의 실험계를 이용하여 이 단백질의 합성과정을 추적하였으며 얻어진 결과를 토대로 천연단백질 형태의 AMHP가 어떻게 형성되는지에 대하여 추론하였다.

재료 및 방법

1. 공시곤충 및 사육

본 실험에 사용한 누에품종은 백옥잠(잠123×잠124)이며, 실험 곤충은 잠업시험장의 표준사육관리법에 따라 사육하였다.

2. 시료 단백질의 조제

알 단백질 시료는 즉침 후 제3일 및 8일째의 알을 채취하여 3배량(W/V)의 차가운 PBS(pH 8.3)를 가해 glass homogenizer로 마쇄하고 12,000×g에서 15분간 저온(4°C) 원심분리한 상등액을 사용하였다. 추출된 단백질 시료는 -20°C에 냉동 보관후 필요할 때 꺼내어 전기영동분석에 사용하였다.

체액은 유충, 번데기 및 나방으로 부터 필요한 시기에 적정량을 채취하였고 이때 시험관내에 미리 소량의 phenylthiourea를 넣어 체액의 melanosis를 방지하였다. 수집된 체액은 누에알에서와 같은 조건으로 저온원심분리하고 얻어진 상등액을 -20°C에 냉동보관 후 필요할 때마다 꺼내어 전기영동용 시료로 사용하였다.

3. 전기영동

천연단백질의 polyacrylamide gel 전기영동(Native-PAGE)은 Davis(1964) 방법에 따라 slab형 겔을 사용하였으며 이때의 분리겔의 농도는 7.5%로 하였다. 영동이 완료된 겔은 7% 초산액에 용해한 0.05% coomassie brilliant blue R-250으로 1일간 염색한 후 7% 초산액으로 충분히 탈색하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli(1970), Weber and Osborn(1969) 등의 방법에 준하였으며 분리겔의 농도는 15%로 하였다. 시료단백질의 SDS 처리는 최종농도 1% β-mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 6.8) 및 20% glycerol 혼합액에서 100°C에 5분 동안 하였다. 영동은 Tris-glycine 완충액(5 mM Tris, 8 mM glycine, pH 8.3)을 사용하여 40 mA의 정전류를 5시간동안 흐르게 하였다. 영동이 끝난 겔은 고정액(methanol : glacial acetic acid : water = 40 : 7 : 53)에 10시간 동안 고정한 후 동용액에 용해한 0.025% coomassie brilliant blue R-250으로 1일동안 염색한 후 고정액으로 충분히 탈색하였다.

4. Autoradiography

누에 나방의 개체당 10 μ Ci의 [³⁵S]-methionine을 나방의 체강안에 주사하여 25°C에서 3시간 경과한 후 체액을 채취하여 전기영동을 행하였다. 상법에 따라 염색 및 탈색이 완료된 겔을 셀로판지를 이용하여 건조, 필름화하여 노출강화 스크린(Okamoto회사 제품)을 사용, -85°C에서 X-ray 필름(Hyper필름-MP; Amersham International Co.)에 2주간 노출 후 현상하였다.

5. 지방체의 조직배양

지방체 적출을 위해 우화당일의 나방을 무균상에서 2% 포르마린액으로 10분간 침지 소독하고 70% 에탄올로 5분간 처리한 후 건조하였다. 건조된 누에나방으로 부터 무균적으로 지방체를 적출, Grace 곤충 배양액에서 1일간(25°C) 배양한 후, 지방체와 배양액을 각각 분리 채취하여 전기영동 또는 western blot용 시료로 사용하였다.

6. Western blot 분석

Native-PAGE 또는 SDS-PAGE에 의해 분리된 겔상의 단백질을 nitrocellulose(NC)막에 transfer하였으며 단백질의 transfer를 위한 영동은 60V에서 5시간 행하였다. transfer가 완료된 NC막은 5%의 non-fat dry milk TTBS 완충액(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5)으로 blocking하였으며 이어서 TTBS 완충액에서 500배로 희석한 AMHP의 항혈청(李 등, 1992)과 1시간 동안 incubation하였다. 다음, NC막을 TTBS로 washing한 후 TTBS로 3,000배 희석한 biotinylated goat anti-rabbit antibody액에서 1시간 동안 2차 항체반응을 시켰다. 2차 항체반응 후 TTBS에 3,000배로 희석한 streptavidin-biotinylated alkaline phosphatase complex액에 1시간 동안 incubation한 후 AP color development 완충액으로 발색, 목적으로 하는 항원을 검출하였다.

결과 및 고찰

누에의 발육단계별 체액단백질의 조성을 보면 알, 유충, 번데기 및 성충의 각 시기별 특이한 단백질 패턴을 나타내고 있음을 알 수 있다(그림 1). 이와 같은 발육단계별 체액단백질의 특이적인 패턴은 체액내 단백질들의 변태발육에 따른 維持, 新生, 소멸 등에 의한 것으로, 각 발육시기별 생리적 기능수행과 관련한 단백질대사의 결과로 생각된다.

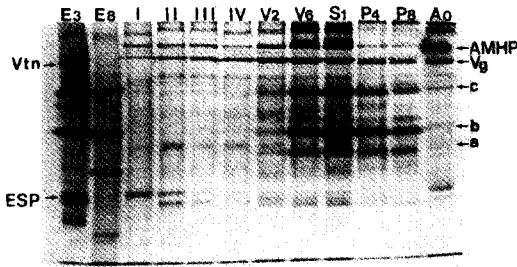


Fig. 1. Changes of haemolymph proteins during developmental stages. 2 μ l of crude egg extracts and 1 μ l of haemolymph in each developmental stage were subjected to 7.5% native-PAGE. E₃, day 3 eggs; E₈, day 8 eggs; I-IV, the first instar larvae to the fourth instar larvae; V₂, day 2 larvae at the 5th instar; V₆, day 6 larvae at the 5th instar; S₁, larvae at spinning stage; P₄, day 4 pupae; P₈, day 8 pupae; Ao, adult; Vg, vitellogenin; Vtn, vitellin; ESP, egg specific protein.

누에의 성충화 발육이 완료되어 우화와 함께 나방의 체액내에 비교적 다량으로 출현하는 AMHP는 이미 보고된 바와 같이, 누에의 모든 품종에서 검출되며 또한 性특이성도 없어 누에의 성충화 완성에 필수적인 단백질성분으로 생각된다(成忠, 1988).

그래서 AMHP의 생리적 기능해명을 위한 연구의 일환으로 본 연구에서는 AMHP의 합성과정을 추적해 보았다.

우선 native AMHP의 합성장소의 구명과 관련하여 단백질합성의 주기관인 지방체에서의 AMHP 존재 여부를 검토하였다. AMHP가 다량으로 출현하는 성충기를 기준하여 우화 3일전의 번데기부터 우화당일까지 지방체에서의 AMHP 검출을 시도하였다(그림 2). 그러나 native 형태의 AMHP는 번데기 또는 성충의 지방체에서 전혀 검출되지 않았다. 같은 시기의 SDS-PAGE 경우 번데기 및 성충의 지방체에는 vitellogenin, 30K를 비롯한 다수의 peptides가 검출되었으며(그림 2) 특히 AMHP의 구성 subunit인 18K 및 20K 단백질이(李 등, 1992) 검출되었다.

이와 같은 결과는 지방체에서의 AMHP의 존재형태는 18K, 20K의 polypeptide이며 이들의 native 상태의 단백질은 적어도 이 시기의 지방체에는 존재하고 있지 않음을 나타내 준다 하겠다. 따라서 AMHP의 지방체에서의 합성 및 합성 후 체액에의 방출 등을 추적하기 위해 autoradiography, 지방체 배양 및 western blot 등의 실험을 행하였다.

우선 AMHP의 누에 나방 체내에서의 합성을 확인하기 위해 [³⁵S]-methionine 10 μ Ci를 우화당일 나방의 체강안에 주사 pulse labelling하여 3시간 경과

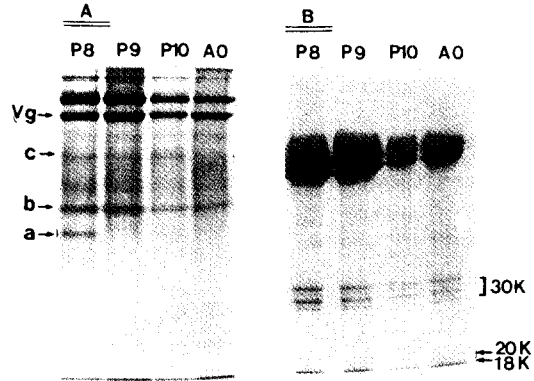


Fig. 2. Native-PAGE and SDS-PAGE patterns of fat body proteins of female silkworms during the end of pupal-adult development. a, b, and c bands indicate MHP-a, b, and c(Seong et al., 1985). Vg, vitellogenin; P₈-P₁₀, corresponding pupal stages in days; Ao, adult; 30K, 30K protein in kilodalton; 18K, 18K protein in kilodalton; 20K, 20K protein in kilodalton; A, native-PAGE; B, SDS-PAGE.

후 체액을 채취하여 native PAGE한 후 autoradiography하였다(그림 3).

Autoradiography 실험결과, native-PAGE로 분리된 성충체액 단백질 가운데 대부분의 단백질 밴드에서 [³⁵S]-methionine의 incorporation이 인정되므로써 성충화시의 성충체내에서는 단백질합성이 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

특히 AMHP성분에서 강한 incorporation을 보임으로써 누에 성충화와 함께 AMHP가 다량으로 합성되고 있음이 확인되었다.

다음, AMHP의 합성장소를 알기 위해 누에 체액 단백질의 주된 합성장소(Izumi et al., 1989)로 알려져 있는 지방체를 적출, *in vitro* 배양하여 지방체의 AMHP 합성여부를 조사하였다. 즉 성충의 지방체를 무균적으로 적출하여 Grace 배양액에서 24시간 배양 후 지방체와 배양액을 따로 분리하여 native-PAGE 및 SDS-PAGE분석 후 western blot으로 AMHP의 항원성을 확인하였다. 실험결과 AMHP의 항원성이 지방체 배양산물(배양액)에서 native-PAGE상의 AMHP 위치에(그림1) 명확하게 검출되었다(그림 4). 그러나, 배양이 완료된 지방체조직의 추출물로 부터는 동일한 위치에 희미한 정도의 항원성만이 인정될 뿐이었다. 즉, AMHP는 지방체에서 합성되어 배양액으로 방출되는 사실이 확인되었다.

한편 동일한 성충의 지방체 배양산물액과 지방체추출물을 SDS-PAGE로 분석하고 western blot에 의해 그의 항원성을 검토한 결과, 18K, 20K의 위치

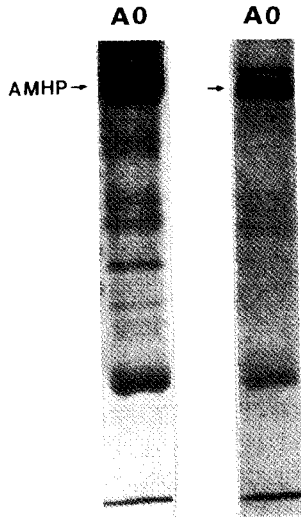


Fig. 3. Labelling profile of *Bombyx mori* haemolymph proteins with ^{35}S -methionine. The haemolymph was labeled for 3 hrs with ^{35}S -methionine. Left is non-labeled, and right is labeled. The arrow shows synthesis of adult major haemolymph protein (AMHP). Ao, adult.

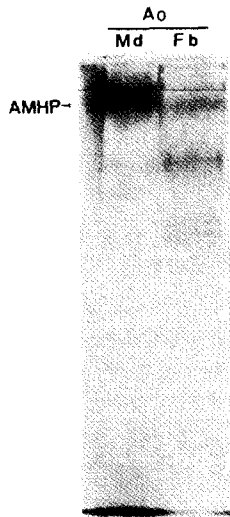


Fig. 4. Immunoblotting of AMHP for proteins extracted from fat body culture. The proteins were subjected to 7.5% native-PAGE. The proteins in the gel were blotted to nitrocellulose membrane and then reacted with antibody raised to purified AMHP. Ao, adult; Fb, protein extracts from cultured fat body; Md, medium extracted from fat body culture; AMHP, adult major haemolymph protein.

에서 AMHP의 항원성이 확인되었다(그림 5). 특히 SDS-PAGE의 경우는 native-PAGE의 결과와는 달리

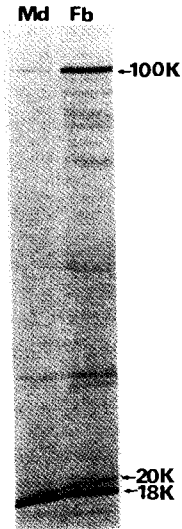


Fig. 5. Immunoblotting of AMHP for proteins extracted from fat body culture. The proteins were subjected to 15% SDS-PAGE. The antibody was anti-AMHP. 100K, 100K protein in kilodalton; 20K, 20K protein in kilodalton; 18K, 18K protein in kilodalton.

18K, 20K의 항원성이 배양산물액 뿐만 아니라 지방체의 추출물에서도 검출되고 있었다. 이러한 결과는 AMHP가 18K, 20K 정도의 polypeptide subunit를 갖고 있다는 前報(李, 1992)의 실험결과를 재확인시켜 주었을 뿐만 아니라 성충의 체액내에 존재하고 있는 AMHP의 생성과정에 대한 해석을 가능하게 해주고 있다.

즉, 지방체와 배양산물액에 공통적으로 존재하고 있던 18K, 20K 단백질들이, 천연의 AMHP의 형태로서는 지방체내에 흔적적인 양으로 존재하는 것에 비해 배양액내에는 다량으로 존재하고 있는데, 이와 같은 결과는 지방체에서 AMHP의 subunits가 합성된 후 배양액(체액)으로 방출되어 최종적으로 천연의 AMHP가 구축되고 있음을 말해주는 것으로 추정된다.

성충화와 함께 성충체액내에 다량으로 존재하는 AMHP는 그 분자내에 糖이나 지질을 포함하고 있지 않은 단순단백질이며(李, 1992) 누에의 lipophorin을 구성하는 분자량 20K 정도의 ApoIII 단백질이 포함되어 있는 것으로 거의 밝혀졌으나(土田, personal communication) ApoIII와 AMHP와의 관계는 추후 보다 정밀하게 검토되어야 할 것이다.

적 요

누에의 성충체액 주단백질(AMHP)의 생리·생화

학적 기능을 구명하기 위한 연구의 하나로 AMHP의 생체내 합성과정을 autoradiography, 효소 혈청학적 방법 및 지방체의 *in vitro* 배양실험 등에 의해 조사하였다. 그 결과 성충의 지방체는 AMHP의 subunit인 18K 및 20K의 polypeptide를 합성하여 체액중으로 방출하며, 방출된 이들은 체액중에서 서로 결합하여 천연의 AMHP를 형성하는 것으로 확인되었다.

引用文獻

- 芽野春雄 (1987) 리포호린과昆蟲. 蛋白質 核酸 酵素. **32**(12): 1413-1421.
- 芽野春雄 (1993) 昆蟲의長距離飛行의分子的メカニズム. 科學. **61**(11): 743-751.
- Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. In gel electrophoresis. By J. F. Fredrich. Ann. New York Acad. sci. **121**: 404.
- Gamo, T. (1978) Low molecular weight lipoproteins in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*; Inheritance, isolation and some properties. Insect Biochem. **8**: 457-470.
- Inagaki, S., Nahamusa, K., Kobayashi, M. and Yamashita, O. (1987) Cloning of a cDNA coding for egg specific protein of the silkworm, *Bombyx mori*, using an *Escherichia coli* expression vector. J. Seric. Sci. Jpn. **56**(5): 394-397.
- Izumi, S., Tojo, S. and Tomino, S. (1980) Translation of fat body mRNA from the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **10**: 429-434.
- Izumi, S. and Tomino, S. (1983) Vitellogenin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*; Separate mRNAs encode two subunits of vitellogenin. Insect Biochem. **13**(1): 81-85.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. Nature(London). **227**: 680-685.
- 이상몽·성수일·강현아·문재유 (1992) 인시목곤충의 성충체액단백질에 관한 생리·생화학적 연구. II. 누에의 성충 특이 체액단백질의 분리·정제 및 분자적 특성. 한삼학지. **34**(1): 30-34.
- Mounier, N. and Coulon, M. (1991) Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. Insect Biochem. **21**(5): 523-533.
- Ono, S., Nagayama, H. and Shimura, K. (1975) The occurrence and synthesis of female and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **5**: 313-329.
- Pan, M. L., Bell, W. J. and Telfer, W. H. (1969) Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. Science. **165**: 393-394.
- Price, G. M. (1973) Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. Biol. Rev. **48**: 333-375.
- Ryan, R. O. (1990) Dynamics of insect lipophorin metabolism. Journal of Lipid Research. **31**: 1725-1739.
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1989) Posttranslational processing in the synthesis of egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **19**(3): 293-300.
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1991) Structure and expression of a gene coding for egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **21**(5): 405-505.
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1991) Synthesis and secretion of egg-specific protein from follicle cells of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **21**(2): 233-238.
- 成洙一 (1986) 누에 體液蛋白質에 關한 生化學的 研究. 韓蠶學誌. **28**(1): 30-36.
- 成洙一·文在裕·李相夢·尹馨珠 (1988) 인시목곤충의 성충체액단백질에 관한 생리·생화학적 연구. I. 가잠의 성충특이 체액단백질의 검출. 한삼학지. **30**(1): 20-24.
- Seong, S. I., Park, K. E., Nagata, M. and Yoshitake, N. (1985) Effect of metamorphosis on the major haemolymph proteins of the silkworm. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. **2**: 91-104.
- Telfer, W. H. (1954) Immunological studies of insect metamorphosis II. The role of sex-limited blood protein in egg formation by the *Cecropia* silkworm. J. Gen. Physiol. **37**: 539-588.
- Tojo, S., Betchaku, T., Ziccardi, V. J. and Wyatt, G. R. (1978) Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm *Hyalophora cecropia*. J. Cell Biol. **78**: 823-838.
- Tojo, S., Nagata, M. and Kobayashi, M. (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. **10**: 289-303.
- Van der Horst, D. J. (1990) Lipid transport function of lipoproteins in flying insects. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1047**: 195-211.
- Van der Horst, D. J., Van Doorn, J. M., De Keijzer, A. N. and Beenackers, A. M. T. (1981) Interconversions of diacylglycerol-transporting lipoproteins in the haemolymph of *Locusta migratoria*. Insect Biochem. **11**: 717-723.
- Weber, K. and M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determination by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **244**: 4406-4412.
- Wyatt, G. R. and Pan, M. L. (1978) Insect plasma proteins. Annu. Rev. Biochem. **47**: 779-817.
- Yamashita, O. (1986) Yolk Protein system in *Bombyx* eggs: synthesis and degradation of egg-specific protein. Adv. Invert. Reprod. **4**: 79-84.