

항유약호르몬 활성물질이 누에탈피에 미치는 영향

홍성진 · 이화준* · 설광열 · 문재유*

농촌진흥청 잠사곤충연구소, *서울대학교 농업생명과학대학

Effect of Anti-juvenile Hormone Analogue (AJH) on the Larval Ecdysis of the Silkworm, *Bombyx mori* L.

Seong Jin Hong, Hwa Jun Lee*, Kwang Youl Seol and Jae Yu Moon*

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, 441-100, Korea

*College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon, 441-744 Korea

ABSTRACT

To clarify the effect of anti-juvenile hormone analogue (AJH) on the larval ecdysis by feeding at early stage of the 4th instar, the total amount of protein and activity of chitinolytic enzymes in the integument of *Bombyx mori* were analyzed, PAGE pattern of the protein was observed and the morphological changes of integument during molting period were also observed by means of TEM. The total amount of protein was greatly increased in premolting, then reached maximum level just before ecdysis, and rapidly decreased after the larval ecdysis in the control, while in the AJH treatment, increased 12 hr later than the control and its maximum was only 82.6% of the control. Two specific proteins, which were presumed as the protein originated from endocuticle, also appeared 12 hr later than the control and were maintained to 132 hr after AJH treatment from the aspects of the Native- and SDS-PAGE patterns, although those of the control disappeared instantly after ecdysis. Chitinase and β -N-acetylglucosaminidase activities were also suppressed and delayed by AJH treatment. Furthermore, it was observed that the apolysis took place 12 hr later than the control but new epicuticle was not formed at least until 132 hr after AJH treatment. From these results, it is suggested that the larval molting process of silkworm develops 12 hr later than the control by AJH treatment but no further processing takes place just after apolysis.

Key words : Anti-juvenile hormone analogue (AJH), Ecdysis, Chitinase, β -N-acetylglucosaminidase, Silkworm

서 론

항유약호르몬 활성물질(AJH)은 유약호르몬의 분비 기관인 알라타체(Corpora allata, CA)를 외과적으로 제거했을 때 유도되는 조숙변태 현상을 인위적으로 유발할 수 있는 화학물질로서 지금까지 수종이 알려지고 있고(村越, 1972; Kiguchi *et al.*, 1984; 三國·河上, 1975), 최근 terpenoid기를 함유한 Imidazole 화합물과 Imidazole계 살균제의 일종이 효과적으로 4면누에를 3면화하는 것이 명백해 지고 있다(Kuwano *et al.*, 1983; Akai *et al.*, 1984; 木内 등, 1985).

한편, 탈피호르몬 및 유약호르몬이 키틴분해효소(chitinolytic enzyme)의 활성에 영향을 미치는 것이 밝혀져 탈피호르몬인 ecdysteroids는 chitinase 활성을 유도하는(Kimura, 1973b) 반면, 유약호르몬 활성물질(JHA)은 chitinase 활성을 억제한다고(Spindler-Barth *et al.*, 1986) 하였고 Koga *et al.*(1991)은 5령 숙잠기에 KK-42를 처리할 경우 β -N-acetylglucosaminidase는 1일, chitinase는 2일 정도 그 활성이 억제된다고 하였다. 또한, 이들 호르몬은 곤충의 탈피 및 변태에 직접 영향을 미치는데 특히, 피부조직에 대한 chitin의 분해, apolysis 및 새로운 표피의 분비활성은 직접적으로

탈피호르몬인 ecdysteroids에 의해 유도된다. 이에 따라 혈중 ecdysteroids 농도와 유충탈피의 조직학적 및 전자현미경적 변화도 연구되어 종령 및 변태기에 대한 time-table이 작성되어있고(森·木口, 1985), 곤충의 유충탈피 및 용화탈피에 대한 조직학적 및 전자현미경적 관찰 결과도 이미 보고되어 있다(森, 1965; 赤井, 1976a, 1976b; 森·赤井, 1984).

그러나 아직까지 AJH나 JH처리가 누에탈피에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 조사·보고된 바 없다. AJH를 처리했을 때 대조누에가 면에 들 무렵 AJH처리누에의 피부는 광택이 나면서 단단해지는데, 이후 누에가 숙잠이 되어 고치를 지을 때까지 이 상태를 유지한다. 육안으로도 관찰되는 이러한 변화가 생리학적으로 검토, 조사된 바 없기에 본 실험에서는 4령 누에에 AJH를 처리했을 때 누에피부의 총단백질의 양적차이, 그리고 키틴분해효소 활성변화와 전자현미경적 관찰을 토대로 AJH 처리가 누에 탈피과정에 어떠한 영향을 미치는 가에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시곤충 및 Anti-JH(AJH) 처리

Imidazole계 살균제의 일종인 Lipsol, ((E)-4-chloro-a,a,a-trifluoro-N-[1(1H-imidazole-1-yl)-2-propoxyethylidene]-o-toluidine)을 홍 등(1992)의 방법에 따라 Lipsol 500배액에 뽕잎을 침지한 후, 풍건하여 4령 인 누에 (잠123×잠124) 부터 48시간 동안 급상하였다.

2. 누에피부의 조제

4령 향식후 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 시간째에 Buffer(50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 20% sucrose, 1 mM diisopropylphosphofluoridate, 소량의 phenylthiourea)하에서 누에를 해부하여 소화관, 실샘, 말피기관, 습관 등을 제거한 후, 해부칼을 이용하여 누에피부의 지방을 최대한 제거하여 이를 누에 피부로 하였다. 누에피부는 Buffer액에서 잘 씻은 후 -20°C에 냉동하여 필요시 꺼내어 사용하였다.

3. 효소액의 조제

누에피부를 액체질소하에서 유발을 사용하여 잘 마쇄한 후 누에피부 무게의 3배량의 Buffer를 가하여 균질화하였다. 이 균질액을 4°C, 11,000 rpm에서 30분간 원심하여 상층액을 취하여 이를 β -N-acetylglucosaminidase에 대한 효소액으로 사용하였다. 한편, 상층액을 ammonium sulfate로 30-70% 염석하여 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8에서 2일간 투석

하여 이를 chitinase에 대한 효소액으로 하였다.

4. 단백질 정량

단백질 정량에 사용한 시료는 β -N-acetylglucosaminidase의 효소활성 측정에 사용한 효소액을 사용하였다. 시료 20 μ l를 뷰렛시약과 혼합하여 25°C에서 30분간 방치한 후 PHOTOMETER-5010을 사용, 546 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

5. 전기영동

Native-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)는 Davis(1964) 방법에 따라 slab형 polyacrylamide gel을 사용하였으며, 이때의 분리 및 농축겔의 농도는 각각 7.5%, 2.5%였다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법에 준하였으며, 분리 및 농축겔의 농도는 10%, 2.5%로 하였다.

6. β -N-acetylglucosaminidase 활성검정

p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside(pNpGlcNAc)를 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0에 녹여 최종농도가 0.005M이 되게 하여 이를 기질액으로 사용하였다. 활성측정은 효소액 20 μ l에 기질액 2 ml를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 끓는 물에서 15분간 가열하여 반응을 중지시킨 후 402 nm에서 흡광도를 측정하여 β -N-acetylglucosaminidase의 활성을 결정하였다.

7. 콜로이달키틴의 조제

콜로이달키틴의 조제는 Shimahara and Takikuchi (1988)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 염산 20 ml를 5°C 이하로 냉각하여, 교반하면서 분말키틴 0.5 g을 소량씩 가한다. 키틴이 균일하게 분산된 뒤, 서서히 가온하여 37°C로 30분간 그 온도를 유지한다. 30분후 미용해의 키틴을 glass wool을 사용하여 흡입여과한 후, 이 여액을 5°C 이하로 냉각한 이온교환수 200 ml 중에 부어넣고, 심하게 교반한다. 2~3분후 이내에 액이 백색으로 흐려지면 30분간 교반한 뒤 5°C에서 밤새 방치한 다음 여과한다. 여과와 현탁을 반복하여 현탁액의 pH가 5 이상이 되었을 때 이를 chitinase에 대한 기질액으로 사용하였다.

8. Chitinase 활성검정

Chitinase 활성의 측정은 Imoto and Yagishita(1971) 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 효소액 20 μ l에 콜로이달키틴액(2 mg/ml, dry base) 1 ml를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2 ml의 발색액 (0.5g po-

tassium fericyanide, 0.5M sodium carbonate 1 l)을 첨가하여 끓는 물에서 15분간 가열한 다음 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액 중의 N-acetylglucosamine(NAG)의 농도를 420 nm의 흡광도에서 측정하여 chitinase 활성을 결정하였다.

9. 전자현미경 관찰

4령기에 AJH를 처리한 후 대조구의 누에가 면에 들어가는 시점(최면기, 4령 향식후 86시간째)을 기준으로 하여 최면후 4시간째(4령 향식후 90시간째), 12시간째(4령 향식후 98시간째)에 각각 누에를 해부하여 7번째 마디를 떼어낸 후, 최대한 지방체를 제거하여 3% glutaraldehyde로 1차 고정하고, 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 씻은 후, 1% OsO₄를 함유한 동 완충액에서 2차 고정하였다. 그 후 50, 70, 90, 100% 에탄올 및 아세톤으로 탈수하고 EPON 수지(EPON812)에 포매한 뒤, LKB-Ultratome (MT-5000)으로 초박절편을 작성하여 투과전자현미경(transmission electron microscopy)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 누에피부 중 총단백질의 양적변화

누에피부 중의 총단백질의 양적변화를 조사해 본 결과 대조누에의 총단백질량은 4령 향식후 60시간째까지는 다소 증가하는 경향이었으나 이후 그 양이 감소하여 면에 들기 직전인 84시간째에는 누에피부 중 총단백질량이 가장 적었다. 그러나 누에가 4면에 들기 시작하면서 누에피부중의 총단백질량은 다시 증가하기 시작하여 면후기인 120시간째에 최대활성을 보였고 탈피와 더불어 다시 급격히 감소하였다(그림 1). 즉, 누에피부의 단백질 합성능은 식상기에는 다소 높은 수준을 나타내다가 최면단계에서는 감소하지만 다시 면기, 특히 면후기에 급격히 증가하는 것으로 보인다. 한편 4령 초기에 AJH를 처리하면 누에피부 중의 단백질량의 변화는 대조누에가 면에 들기 시작하는 4령 향식후 84시간째까지 일정한 수준을 유지하였으나, 이후 급격히 감소하여 96시간째에 최소치를 보인 후 다시 급격히 증가하여 108시간째 이후 일정한 수준을 유지하였다(그림 1). 그러나 AJH 처리 누에피부 중의 총단백질량은 대조누에가 면에 들기 하루전부터 서서히 감소한 것과는 달리 향식후 84시간째부터 96시간째까지 12시간 사이에 급격한 감소가 일어났고, 다시 급격히 증가하였으나 최고치는 대조누에 최고치의 82.6% 정도였다.

이러한 결과는 AJH를 처리한 누에에서도 시간적

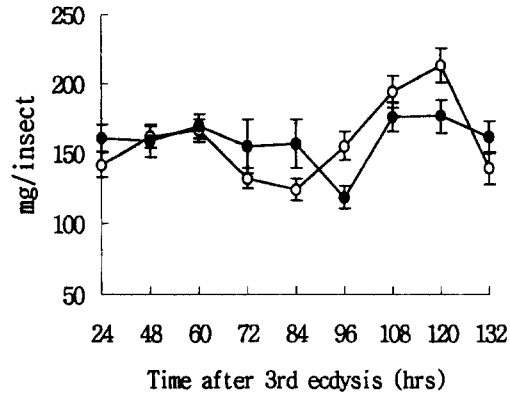


Fig. 1. Change of the total amount of protein in the integument of silkworm. Quantification of total protein was measured by PHOTOMETER-5010 using of burets method. AJH was treated on the 3rd exuviated larvae for 48 hrs by feeding mulberry leaves soaked in the 500-fold diluted solution of Lipsol. open circles : control, solid circles : AJH-treated larvae. Mean value SE, n=4

으로는 대조누에보다 지연되지만 최면기의 단백질 합성능 감소와 면기의 합성능 증가가 내부적으로 일어남을 시사하는 것으로 생각된다.

2. 단백질 전기영동상 비교

누에피부에 대한 비변성 전기영동(Native-PAGE) 결과 대조누에의 경우 4령 향식후 108시간째가 되면 식상기 및 최면초기인 24~96시간째에는 보이지 않던 새로운 단백질 밴드인 tp-2, tp-3이 새로 생겨나고 tp-1 및 tp-4의 밴드농도가 현저히 증가하였으나 120시간째가 되면 tp-2 및 tp-3은 밴드가 소실되고 tp-1 및 tp-4 밴드의 농도가 현저히 감소하여 누에가 탈피한 직후인 132시간째는 tp-1을 제외하고는 나머지 밴드는 인정되지 않았다(그림 2A). 한편, AJH 처리 누에피부 중의 단백질 패턴은 108시간째까지는 대조누에의 단백질 패턴과 같았으나 12시간 늦은 120시간째에는 그 패턴이 변하여 132시간째까지 지속되었다. AJH 처리누에의 120시간째의 단백질 패턴은 대조누에의 108시간째와 비슷한 모양을 보여 tp-2, tp-3가 새로 나타나고 tp-1은 그 농도가 증가하였으나 tp-4는 그 농도의 증가가 인정되지 않았다(그림 2B).

AJH 처리 누에피부에 대한 SDS-PAGE 패턴은 대조누에보다 12시간 늦은 120시간째에 dp-1의 농도가 높아졌고, 132시간째에도 그 농도가 계속 유지되었다(그림 3). 이러한 결과는 면기중 누에피부의 단백질 합성능이 AJH 처리에 의해 12시간 정도 늦어지는 사실(그림 1)과 잘 일치하고 있다.

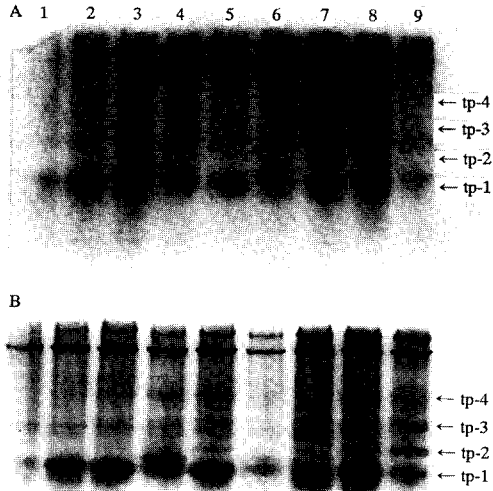


Fig. 2. Native-PAGE of integumental proteins of the silkworm. AJH treatment was performed as described in Fig. 1. Extracts (2.5 μ l) of the integuments of control silkworm larvae [Panel (A)] and AJH-treated ones [Panel (B)] were subjected to 7.5% polyacrylamide gel and stained coomassie brilliant blue. Numbers on the top panel represent 1, 24; 2, 48; 3, 60; 4, 72; 5, 84; 6, 96; 7, 108; 8, 120; 9, 132 hrs after the 3rd ecdysis, respectively

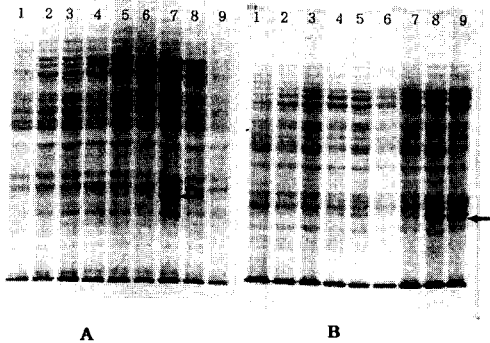


Fig. 3. SDS-PAGE of integumental proteins of the silkworm. AJH treatment was performed as described in Fig. 1. Extracts (2.5 μ l) of the integuments of control silkworm larvae [Panel (A)] and AJH-treated ones [Panel (B)] were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel and stained coomassie brilliant blue. Numbers on the top panel represent 1, 24; 2, 48; 3, 60; 4, 72; 5, 84; 6, 96; 7, 108; 8, 120; 9, 132 hrs after the 3rd ecdysis, respectively. Arrow indicate dp-1 protein appeared newly.

3. AJH가 β -N-acetylglucosaminidase 활성에 미치는 영향

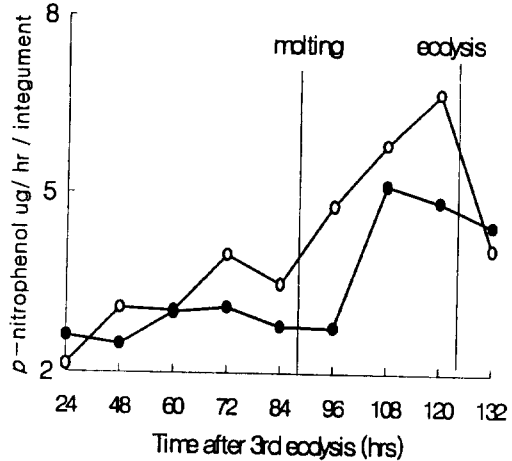


Fig. 4. β -N-acetylglucosaminidase activity during the 4th instar of the silkworm. AJH treatment was performed as described in Fig. 1. Enzyme activity was detected by measuring the amount of p-nitrophenol cleaved from p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (pNpGlcNAc). open circle : Control, solid circle : AJH-treated silkworm larvae. Mean value SE, n=6

4령 항식후 누에 피부의 β -N-acetylglucosaminidase의 활성은 면에 들기 전까지는 서서히 증가하는 모습을 보였으나 누에가 4면에 들기 시작하는 84시간째 무렵부터 급격히 그 활성이 증가하기 시작하여 탈피 직전인 120시간째에 최대활성을 보인 후 탈피와 동시에 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타내어(그림 4) Kimura (1973a)의 보고와 일치하였다. 한편 AJH를 처리했을 경우에는 대조와 달리 96시간째까지는 활성의 변동이 거의 없었으나 이후 그 활성이 급격히 증가하여 108시간째에 최대활성을 보인 후 점차 감소하였다(그림 4). 또한 대조누에의 β -N-acetylglucosaminidase 활성이 면기간 내내 계속 직선적으로 증가해서 탈피 직전에 최대활성을 보인 것과는 달리 AJH 처리누에는 그 증가시간이 12시간 정도였고, 최대활성도 대조의 77% 정도에 불과하였다. 이상의 결과로부터 AJH 처리는 β -N-acetylglucosaminidase의 활성을 적어도 12시간 이상 억제시키는 것으로 생각된다. 이 결과는 Koga 등(1991)이 숙잠기 누에에 AJH의 일종인 KK-42를 처리(50 μ g/insect)하였을 때, β -N-acetylglucosaminidase의 활성이 하루 정도 늦어졌다고 한 것과 같은 경향이다.

4. AJH가 Chitinase의 활성에 미치는 영향

누에피부의 chitinase 활성은 식상기 중에는 비교

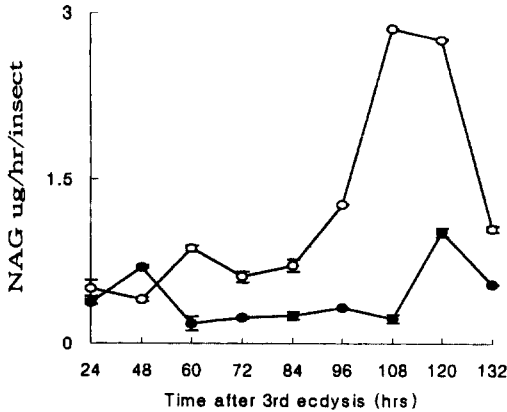


Fig. 5. Chitinase activity during the 4th instar of the silkworm. AJH treatment was performed as described in Fig. 1. Enzyme activity was detected by measuring the amount of N-acetylglucosamine (NAG) cleaved from colloidal chitin. open circles: Control, solid circles: AJH-treated silkworm larvae. Mean value SE, n=4

적 낮은 수준의 활성을 보였으나 누에가 면에 들어가기 시작하는 84시간째부터는 그 활성이 급격히 증가하기 시작하여 108시간째에 최대활성을 보인 후 감소하기 시작하였는데 탈피 직전인 120시간째까지는 높은 활성을 유지하였으나 탈피와 더불어 chitinase 활성은 급격히 감소하였다. 최대활성을 보인 108시간째의 chitinase 활성은 4령 초기인 24시간째에 비해 약 5.7배 가량 활성이 증가하였다(그림 5). 이러한 결과는 Kimura (1973a)가 발표한 4령기의 chitinase의 활성변화와 일치하는 경향으로 누에의 apolysis 후 급격한 chitinase의 활성증가와 탈피시가지의 활성유지가 누에탈피를 원활하게 하는 것으로 보인다. 한편 4령초기에 AJH를 처리하면 chitinase의 활성은 매우 억제되어 대조의 1/3 수준으로 그 활성도가 매우 낮았다. 이러한 경향은 대조누에가 최대활성을 보인 108시간째까지 지속되었으나, 이후 급격히 활성이 증가하여 120시간째에 최대활성을 보였고 이후 다시 그 활성이 감소하였다(그림 5). 따라서 AJH 처리는 누에의 chitinase의 활성을 억제하는 것으로, 그 억제시간은 24시간 이상인 것으로 생각된다. 한편 AJH 처리시 chitinase의 최대활성을 보인 120시간째의 활성은 대조 누에피부 중 chitinase의 최대활성의 1/3 정도의 수준으로 대조누에의 면 초기인 96시간째 정도의 수준이었다. 이러한 결과로 보아 AJH는 누에피부 중의 키틴분해효소에 대해 그 활성억제력이 β -N-acetylglucosaminidase 보다 더 큰 것으로 생각된다. 또한 대조누에 피부중의 chitinase 활성이 면초기에 증가하기 시작하여 탈피 직전까지

36시간 동안 유지된 반면 AJH 처리 누에피부 중의 chitinase 활성은 108시간째부터 120시간째까지의 12시간 정도로 대조누에의 활성지속시간의 1/3 정도에 불과하였다.

5. AJH처리 누에피부의 전자현미경적 관찰

누에가 4령 최면에 들어간 때를 기준으로 해서 최면 후 4시간째에 누에 피부를 전자현미경적으로 관찰한 결과, 표피와 진피세포 사이에 간격이 생겨있는데 이미 표피의 분해가 일어나 apolysis가 시작된 것으로 생각된다. 그러나 이 시기에는 진피세포 선단부의 미세융모(microvilli)는 불활성의 상태로서 상표피의 분비는 아직 개시되지 않고 있다. 또한 이 시기에는 세포질에 전자밀도가 낮은 명조의 소구가 다수 관찰되는데 이는 森·赤井(1984)가 누에의 3면기(2령 최면 후 1시간째)에 찍은 전자현미경 사진과 비슷한 모양을 보였다(그림 6). 한편 AJH를 처리한 누에에서는 진피세포의 선단부(진피세포와 내표피 사이)에 신생 세포층이 발달되어 있고, 진피세포에는 전자밀도가 낮은 명조의 소구들로 가득 차 있으며 세포핵은 세포의 비교적 내층부분인 기저막 근처에 위치해 있으나 핵전체가 대략 같은 크기의 과립으로 충만해 있어 전체적으로는 유충의 식상기 때의 피부구조와 비슷한



Fig. 6. Old cuticle and epidermal cell at 90hr after the 3rd ecdysis of the control silkworm, showing apolysis. enc, endocuticle; N, nucleus. (X 6,000)

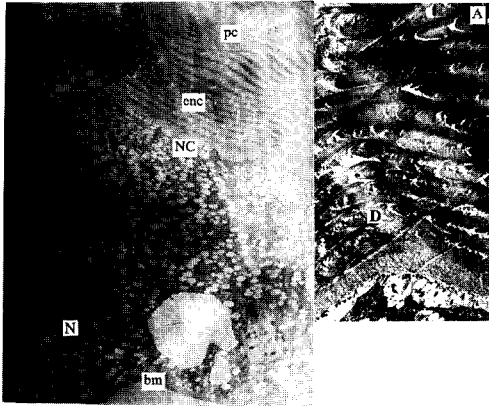


Fig. 7. Integument at 90hr after the 3rd ecdysis of the AJH-treated silkworm. bm, basement membrane; enc, endocuticle; N, nucleus; NC, new cuticle layer; pc, pore canal, D, ecdysial droplets; (X 4,680) A: Endocuticle magnified (X 10,800)

모양을 나타내고 있다(그림 7). 그러나 핵전체에 대략 같은 크기의 과립으로 충전해 있는 점, 대형의 공포가 출현한 점(그림 7), 또한 치밀층은 영층의 표피의 형성이 거의 완료되는 최면기 근처에 출현하며 이 시기에 전자밀도가 높은 분비물이 진피세포로부터 신생층으로 방출되어 이 분비물이 신생층에서 몇 개가 합

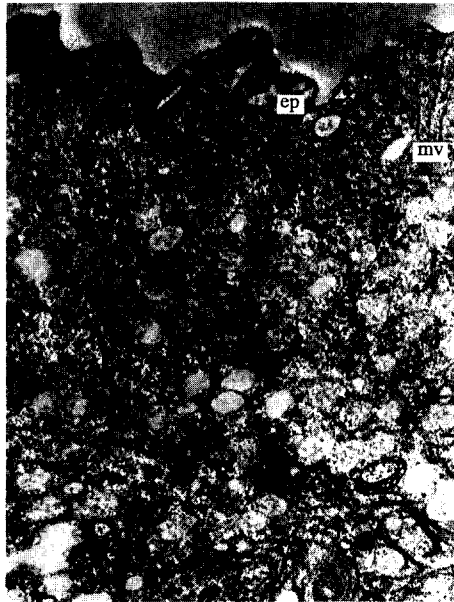


Fig. 8. New epicuticle and epidermal cell at 98 hr after 3rd ecdysis of the control silkworm. ep, epicuticle; mv, microvilli (X 10,800)

쳐져 대형의 적상물(ecdysial droplets)이 된다고 하는데(森, 1970), 치밀층과 대형의 적상물이 보이는 점(그림 7A)으로 미루어 볼 때 최면기 상태에 들어가고 있는 상태인 것으로 판단된다.

한편 그림 8에서와 같이 대조누에의 경우 4령 항식 후 98시간(최면후 12시간)이 경과한 시기의 진피세포에는 세포질 선단부의 표면에 1층의 상표피층이 형성되지만 이 층은 기복이 매우 현저해 보인다. 그리고 미세융모도 매우 발달해 있어 최면 중기의 피부구조를 나타내고 있다. 반면 AJH 처리누에는 이 시기에 진피세포와 표피 사이에 간격이 벌어져 표피의 분해가 일어나 apolysis가 일어나고 있는 것처럼 보인다(그림 9). 따라서 AJH 처리시 누에는 외부에서 보이듯 유충탈피과정이 생략되지 않고 내부적으로는 유충탈피과정이 일어나는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 AJH 처리 누에는 첫째, 외부적으로는 탈피가 전혀 일어나지 않는다는 점, 둘째 누에 피부중의 총단백질량이 AJH 처리에 의해 12시간 정도 지연되어 합성이 시작되지만 그 합성능은 대조누에의 82%에 불과하다는 점(그림 1), 셋째 누에피부의 전기영동 결과 표피의 분해산물로 보이는 특이밴드가 대조누에보다 12시간 정도 지연되어 출현하나 이후 계속 그 밴드가 유지된다는 점(그림 2, 3), 넷째 β -N-acetylglucosaminidase의 활성이 대조누에보다 12시간 정도 늦게 나타났고 그 활성

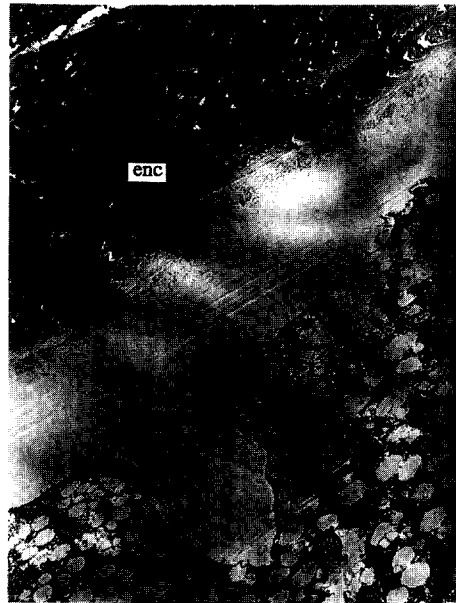


Fig. 9. Integument at 98 hr after 3rd ecdysis of the AJH-treated silkworm. enc, endocuticle (X 10,800)

인용문헌

도가 77% 정도에 머무르는 점(그림 4), 다섯째 chitinase의 활성이 대조누에보다 24시간 늦게 나타나고 활성도 및 활성지속시간이 1/3 정도에 불과하다는 점(그림 5), 여섯째 항식후 90시간째의 누에피부를 전자현미경적으로 관찰했을 때 AJH 처리시 다량의 적상물(ecdysial droplets)이 신생세포층을 통과하여 내표피의 간격이 넓은 곳에 보이는 점(그림 7) 등을 고려해 볼 때 누에에 AJH를 처리하면 대조누에보다 12시간 정도 늦게 apolysis가 일어나지만 이후 표피의 분해가 완전히 일어나지는 않고 진피세포와 표피 사이에 간격이 벌어진 채로 탈피과정이 중단되는 것으로 추정된다. 그러나 AJH 처리 누에피부 중의 내표피의 분해가 어느 정도까지 일어나는지, 구내표피와 진피세포 사이에 신상표피를 포함한 새로운 표피층이 형성되는지 하는 점은 추후 자세한 검토가 필요한 것으로 생각된다.

적 요

항유약호르몬 활성물질(AJH)이 누에탈피시 어떠한 영향을 미치는가를 알기 위하여 누에 피부층의 총단백질량, 단백질의 전기영동 패턴 및 키틴분해효소 활성과 4면기중의 전자현미경적 관찰을 토대로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. AJH 처리는 누에 피부층의 단백질 합성에 영향을 미쳐 대조누에보다 12시간 늦은 4령 항식후 96시간째부터 면기특성을 보였으며, 최대 단백질량은 대조누에의 82.6%로 억제되었다.
2. 누에피부 단백질의 전기영동 결과 AJH를 처리했을 때 표피의 분해산물로 보이는 특이단백질 밴드가 대조누에 보다 12시간 늦게 출현하였는데 대조누에의 경우 12시간 후에 소실된 반면 AJH 처리누에에서는 항식후 132시간째 까지 계속 출현하였다.
3. β -N-acetylglucosaminidase의 활성은 AJH 처리에 의해 억제되어 대조누에보다 12시간 늦게 면기특성을 보였으며 최대활성도 77% 수준이었다.
4. chitinase의 활성도 AJH 처리에 의해 억제되었는데 그 억제정도는 β -N-acetylglucosaminidase보다 강하여 대조누에보다 24시간 정도 늦게 활성증가가 일어났으며, 최대활성 및 활성지속시간도 1/3 정도에 불과하였다.
5. 4면기중 누에피부의 전자현미경적 관찰 결과 대조누에는 항식후 90시간째에 apolysis가 일어나 진피세포와 내표피 사이에 간격이 생기고 98시간 후에는 새로운 상표피가 형성되었으나 AJH를 처리하면 apolysis가 12시간 정도 늦게 일어났다.

赤井 弘 (1976a) 昆蟲超微形態學. 290pp., 東大出版會, 東京.

赤井 弘 (1976b) 昆蟲の表面構造. 139pp., 東大出版會, 東京.

Akai, H., K. Kimura, M. Kiuch and A. Shibukawa (1984) Effects of anti-juvenoid treatment on cocoon and cocoon filaments in *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **53** : 545-546.

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.

홍성진, 문재유, 이희삼 (1992) Imidazole계 살균제 "Lipsol"에 의한 누에의 3면화 효과. 한국잠사학회 추계학술연구 발표자료, p.36.

Imoto, T. and K. Yagishita (1971) A simple activity measurement of Lysozyme. *Agr. Biol. Chem.*, **35**(7) : 1154~1156.

Kiguchi, K., T. Mori and H. Akai (1984) Effects of anti-juvenile hormone "ETB" on the development and metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **30** : 499-506.

Kimura, S. (1973) Chitinolytic enzymes in the larval development of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera; Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* **8**(4) : 234-236

Kimura, S. (1973) The control of chitinase activity by ecdysteroid in larvae of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **19** : 115-123.

木内 信, 木村敬助, 赤井 弘 (1985) 抗幼若ホルモン活性物質投與による3眠蠶の誘導とその計量形質. *日蠶雜*, **54** : 77-81.

Koga, D., T. Funakoshi, H. Fujimoto, E. Kuwano, M. Eto and A. Ide (1991) Effects of 20-hydroxyecdysone and KK-42 on chitinase and β -N-acetylglucosaminidase during the larval-pupal transformation of *Bombyx mori*. *Insect Bio. Chem.* **21**(3) : 277-284

Kuwano, E., R. Takeya and M. Eto (1983) Terpenoid imidazoles: New anti-juvenile hormones. *Agric. Biol. Chem.*, **47** : 921-923.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 685.

三國長男, 河上 清 (1975) カイコの脱皮・變態におよぼす緑きょう病菌 (*Spicaria prasina*)生産物質の影響. *動昆*, **19** : 203-207.

森 精 (1965) 昆蟲. **33** : 305-426.

森 精 (1970) カイコによる新生物實驗. pp 49-50, 秀文堂

森 精, 赤井 弘 (1984) 家蠶の幼蟲と蛹のクチクラ形成の電顯學的比較觀察. *日蠶雜*, **53**(4), 358-362.

森 精, 木口憲爾 (1985) カイコの終齡期における幼蟲皮膚の組織學的變化と血中エクジステロイド濃度との關係. 日應動昆., **293(4)**: 284-297.

村越重雄 (1972) こうじ酸の經口投與による4眼交配種からの3眼蠶出現について. 動昆. 20; 87-91.

Shimahara, K. and Y. Takiguchi (1988) Preparation of crustacea chitin, "in Method in Enzymology Vol. 161" (eds W. A. Wood and S. T. Kellogg), Academic Press, California, pp 417-423.