

화랑곡나방의 발생에 따른 Esterase Isozymes의 Pattern 변화

박희운 · 이형철 · 유종명
한남대학교 이과대학 생물학과
(1998년 4월 9일 접수)

Changes of Esterase Isozymes During the Development from *Plodia interpunctella* (Hübner)

Hee Yun Park*, Hyung Chul Lee and Chong Myung Yoo
Department of Biology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea
(Received April 9, 1998)

ABSTRACT : Changes in activity and classification of esterase isozymes during the life cycle of *Plodia interpunctella* (Hübner) were investigated by the native polyacrylamide gel electrophoresis. The stage specificity in esterase activity and isozyme pattern was observed throughout the larval-pupal-adult transformation. The activity esterase was highest at the 3-day old adult stage, and the lowest level at the prepupal stage. A total of 12 esterase bands were identified throughout the development, and the bands showing high enzyme activity was observed in the middle part of gel. Twelve esterases on the basis of inhibition by the three types of inhibitors (organophosphates, eserine sulfate and sulfhydryl reagents) were classified into three class, namely, carboxylesterase (CE), arylesterase (ArE) and cholinesterase (ChE), and these classes contained 7, 3 and 2 isozymes, respectively.

Key words : esterase isozyme, *Plodia interpunctella* Hübner, enzyme activity, esterase inhibitor

곤충의 esterase는 광범위한 물질대사에 관여하며, 여러 종류의 isoenzyme으로 구성되어 있다 (Laufer, 1961; Geering과 Freyvogel, 1974; Hideaki와 Ozaki, 1983). Esterase isozyme의 활성도와 pattern은 발생과 변태에 따라 그리고 같은 개체에서도 조직과 기관에 따라 각기 다른 양상을 나타낸다 (Gadallah와 Marei, 1973; Kai 등, 1987; Yoo 등, 1993).

현재 esterase는 기질 및 억제제 특이성을 고려

하여 carboxylesterase(CE), cholinesterase(ChE) 및 arylesterase(ArE) 등으로 분류되고 있다 (Mounter와 Whittaker, 1953; Hideaki와 Ozaki, 1983). Aryl-esterase는 esterase isozyme의 소수 group으로 phenolicester를 포함한 방향족 ester들에 작용하는 효소로 알려져 있으며, cholinesterase는 신경계의 synaps에서 acetylcholine을 가수분해함으로써 신경 흥분전달에 작용함이 밝혀진 바 있다 (Sudderuddin과 Tan, 1973; Randall과 William, 1986; Xu와

* 연락처 : 300-791, 대전광역시 대덕구 오정동 133번지, 한남대학교 이과대학 생물학과

* Corresponding author : Department of Biology, Han Nam University, Ojung-Dong, Taejon 300-791, Korea

Bull, 1994). Carboxylesterase는 많은 ester에 강한 활성을 나타내며, 곤충의 발생 및 변태과정에 있어서 많은 생리, 생화학적 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다(Devonshire, 1977; Kuhn과 Heyman, 1982; Oppenoorth, 1985).

본 연구는 인시목 곤충인 화랑곡나방(*Plodia interpunctella* Hübner)의 발생과 변태에 따른 총체의 esterase(EST) 활성과 isozyme들의 pattern 변화, 그리고 억제제의 반응 특이성 분석을 통하여 isozyme의 분류 및 조성의 변화상을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

대전 근교에서 채집한 화랑곡나방(*Plodia interpunctella* Hübner)을 곤충사육실(Temp.; $27 \pm 1^\circ\text{C}$, RH: 60%, Photoperiod: 16L:8D)에서 인공배지로 누대사육하면서 발생단계별로 1령 유충, 3령 유충, 5령 유충과 전용, 용 1일, 용 3일, 용 5일, 용 7일 그리고 성충 1일, 성충 3일, 성충 5일, 성충 7일된 시료를 각각 채취하여 사용하였다.

시료의 준비

저온실(4°C)에서 각 발생단계별로 채취한 총체의 무게를 측정하고 다음 67mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 40%(w/v)로 균질화시킨 후 4°C 에서 10,000rpm(Backman, J2-21 centrifuge)으로 20분간 원심분리하여 조직질편 및 부유물을 제거한 다음 상등액을 취하여 crude enzyme으로 사용하였다.

Esterase의 활성도 측정

Esterase의 활성도는 Ozaki와 Koike(1965)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 효소용액 1ml을 기질용액(0.3mM β -naphthyl acetate) 5ml에 혼합하여 37°C 에서 20분간 반응시킨 후 0.4% naphthol diazo blue B 용액을 1ml 첨가하여 발색시켰다. 반응액에 40% trichloroacetic acid(TCA) 1ml을 첨가한 다음, absolute ethyl acetate를 10ml 가하여 diazotized red color를 용출시킨 후, 추출한 상등액을 파장 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

Esterase의 활성도는 표준곡선의 함수에 적용하여 효소의 작용에 의해 방출된 naphthol의 유리량($\mu\text{g}/\text{g}$)으로 나타내었다.

Esterase isozyme의 확인

Esterase isozyme의 분리는 Laemmli(1970)의 native-PAGE 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉 7.5% 농도의 polyacrylamide gel에 각 발생단계별 시료 20 μl 씩을 loading하여 처음 2시간은 5mA로, 그 이후는 10mA로 4°C 에서 전기영동을 실시하였으며, isozyme band의 확인은 Van Der Geest와 Borgsteede(1969)의 방법에 준하여 염색한 후 확인하였다.

Esterase isozyme의 억제제 특이성 조사

억제제 특이성 조사는 organophosphate(OP)계인 o,o-dimethyl o-(4-nitrophenyl) phosphate(paraoxon), o,o-dimethyl o-(2,2-dichlorovinyl) phosphate(dichlorvos), diisopropyl phosphorofluoridate(DFP)와 carbamate계인 eserine sulfate 및 sulfhydryl reagent인 para-hydroxyl mercuribenzoate(p-HMB) 등을 $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 농도로 희석하여 전기영동이 끝난 gel에 10분간 처리한 후, gel을 상기의 방법(Van Der Geest와 Borgsteede, 1969)으로 염색하여 각 isozyme band의 억제상황을 분석하였다.

Esterase의 분류

Mounter와 Whittaker(1953)의 분류방법에 따라 3 종류의 esterase로 분류하였는데, carbamate(eserine)와 organophosphate(paraoxon, dichlorvos, DFP)에 저해되는 band는 cholinesterase(ChE)로 분류하였고, organophosphate에만 저해되는 band는 carboxylesterase(CE)로, organophosphate와 sulfhydryl reagent(p-HMB)에 저해되는 band는 arylesterase(ArE)로 각각 분류하였다.

결 과

총체 esterase(EST)의 활성도

화랑곡나방의 총체 esterase(EST) 활성도를 1령 유충에서 성충 7일까지의 발생단계별로 측정하고 결

과는 Table 1과 같다. EST의 활성도는 1령부터 3령 유충까지는 다소 증가하다가 전용시기까지 감소하여 최저수준을 나타내었다. 용 1일부터 효소의 활성이 다시 증가하여 성충 3일에는 최고 수준을

보인 다음 노화가 진행된 성충 7일에는 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 전 발생단계 중 성충 3일에서 최고수준인 932 $\mu\text{g/g}$ 의 활성도를 보였으며, 전용시기에 592 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮은 활성도를 나타내는 것으로 확인되었다.

Table 1. Activity of whole body esterase(EST) during the development of *Plodia interpunctella*

Developmental stages	Esterase activity* (Mean \pm SD)
1st instar larvae	710 \pm 7.55
3rd instar larvae	738 \pm 9.54
5th instar larvae	656 \pm 6.77
prepupae	592 \pm 5.57
1-day old pupae	649 \pm 7.64
3-day old pupae	762 \pm 4.58
5-day old pupae	764 \pm 5.29
7-day old pupae	782 \pm 4.24
1-day old adults	796 \pm 10.54
3-day old adults	932 \pm 6.24
5-day old adults	832 \pm 11.14
7-day old adults	776 \pm 10.61

*: μg of β -naphthol liberated by enzyme action/g of wet weight.

Esterase의 isozyme 확인

화랑곡나방의 전 발생단계를 통한 총체 esterase isozyme을 native-PAGE를 통하여 분리한 결과는 Fig. 1과 같다. 전 발생단계를 통하여 총 12개의 esterase isozyme band들이 분리되었다. 발생이 진행되는 동안 변태에 따라 esterase isozyme 조성의 변화 양상을 확인하였는데, 유충 및 전용시기에서 9개, 용 및 성충시기에서 8개의 band가 각각 확인되었다. Gel상의 zymogram에서 각 band는 음극(-)에서 양극(+) 방향으로 이동도가 가장 큰 것로부터 순서대로 번호를 부여하였으며 각 band의 출현 여부는 Table 2에 요약하였다. Esterase isozyme의 조성은 유충, 전용, 용 및 성충의 발생단계별로 현저한 변화를 보였다. 즉, 1, 2, 7, 8번 band는 전 발생단계를 통하여 확인되었으나 6번 band는 유충시기에만, 3, 4번 band는 유충과 전용시기에만 출현하였다가 활성이 소실되었으며, 5번 band는 유



Fig 1. Changes of esterase isozyme band patterns of whole body esterase(EST) during the development of *Plodia interpunctella*. A: 1st instar larvae, B: 3rd instar larvae, C: 5th instar larvae, D: prepupae, E: 1-day old pupae, F: 3-day old pupae, G: 5-day old pupae, H: 7-day old pupae, I: 1-day old adults, J: 3-day old adults, K: 5-day old adults, L: 7-day old adults.

Table 2. The occurrence of band on the esterase isozymes during the development of *Plodia interpunctella*

No. of band	Rf value	Developmental stages*											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	0.86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	0.80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	0.63	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0.59	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0.55	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	0.42	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0.38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	0.26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	0.11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
11	0.08	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	0.03	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Total		8		9		8				7			

*: The abbreviations are same as in Fig. 1.

+: Present, -: Absent

충 및 전충시기에 강한 활성을 보이고 용시기 부터는 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 9번 band는 성충시기에 새로이 출현되었으며, 10~12번 band는 용시기에 강한 활성을 나타냈으나 성충시기에서 감소되는 양상이 확인되었다. 일반적으로 화랑곡나방의 esterase isozyme중 활성이 강한 band는 주로 gel의 중앙부위에 존재함이 밝혀졌다.

Esterase isozyme의 억제제 특이성

5종류의 억제제 처리결과 gel상의 각 band들의 억제효과는 억제제의 성질에 따라 현저한 특이성을 보였는데, 유기인 제제의 경우에는 전반적으로 강한 억제효과를 나타냈으며, eserine과 p-HMB는 비교적 저해효과가 낮은 것으로 밝혀졌다. Eserine은 1, 2번 band를, p-HMB는 10~13번 band를 억제하였고, 유기인제중 DDVP와 paoxon은 거의 모든 band를, 그리고 DFP는 3, 4번 band를 강하게 억제하는 것으로 확인되었다.

Esterase의 분류

억제제 처리에 따른 esterase isozyme band들의 저해효과를 분석하여 분류한 결과는 Table 3에 요약하였고, Fig. 2에 모든 band를 종합하여 zymogram으로 나타내었다. 전 발생단계를 통하여 carboxylesterase(CE)가 7개로 제일 많았고 cholinesterase(ChE)가 2개, arylesterase(ArE)가 3개로 각각 확인되었다. 정도의 차이는 있으나 각 발생시기 별로 3종류의 esterase를 모두 가지고 있었는데 CE는 gel의 중앙에 강한활성의 band로 나타났으며, ChE는 gel의 음극(-)부위, ArE는 양극(+)부위에 존재하는 것으로 확인되었다.

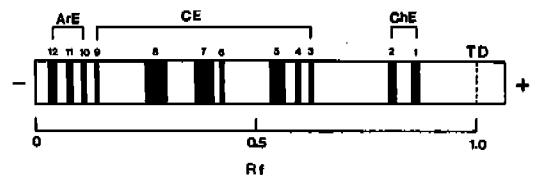


Fig. 2. Zymogram of esterase isozymes detected on throughout the development of *Plodia interpunctella*. TD: Tracking dye.

Table 3. Classification of esterase isozymes of *Plodia interpunctella* on the basis of specific inhibition by 5 inhibitors

No. of band	Inhibitors*					Classes
	Eserine	p-HMB	Paraoxon	DDVP	DFP	
1	+	-	++	++	+	ChE
2	+	-	++	++	+	ChE
3	-	-	++	++	++	CE
4	-	-	++	++	++	CE
5	-	-	++	++	+	CE
6	-	-	++	++	+	CE
7	-	-	++	++	+	CE
8	-	-	++	++	+	CE
9	-	-	++	++	+	CE
10	-	+	+	+	+	ArE
11	-	+	+	+	+	ArE
12	-	+	+	+	+	ArE

*: Treatment of $1.0 \times 10^{-5} M$ inhibitors,

++: Completely inhibited, +: Incompletely inhibited, -: No inhibited,

CE: Carboxylesterase, ChE: Cholinesterase, ArE: Arylesterase

고 찰

곤충 esterase isozyme의 활성 및 band pattern은 변태 및 생식주기, 취식, 외부환경 등의 영향에 따라 그 활성에 많은 변화가 수반된다(Brigel, 1972; Kapin과 Ahmad, 1980; Matthiensen 등, 1993). 본 연구에서도 화랑곡나방은 취식이 활발한 3령 유충 시기에 비교적 높게 유지되었던 효소 활성이 변태가 진행되는 시점인 전용시기까지 감소하다가, 유충조직의 autolysis 및 유충 hormone의 분해가 일어나는 용 시기에 증가하는 수준을 보였는데(Table 1), 이러한 결과는 유충에서 용으로의 변태과정에 따른 조직의 분해, 재배열 및 신생과 관련하여 esterase의 활성이 다소 증가된 것으로 생각된다(Geering과 Freyvogel, 1974; Ahmad, 1976; Kapin과 Ahmad, 1980). 또한 발생이 더욱 진행된 성충 3일에 최대의 효소 활성도를 나타내었는데(Table 1), 이는 지방대사(Ahmad와 Forgash, 1976), 취식의 영향(Brigel, 1972; Kapin과 Ahmad, 1980), 생식의 조절(Gadallah와 Marei, 1973; Yoo 등, 1993) 등 성충의 생리적 활성과 관련되어 있는 것으로 사료

된다.

Euguchi와 Sugimoto(1965)는 곤충의 발생단계에 따라 esterase band의 수와 활성도에 큰 차이가 있다고 보고하였고, Freyvogel 등(1968)은 모기류의 연구에서 esterase의 활성과 band의 수가 종간 혹은 종내의 변태 양상 및 취식, 생리적 특성과 상호 관계가 있다고 보고하였다. 본 연구의 화랑곡나방에서도 각 발생단계에 따라 효소활성, band의 출현 수와 pattern에 차이를 보였다(Fig. 1). 전 발생 단계동안 총 12개의 esterase isozyme band들이 분리되었는데, 이중 유충 특이 band(No. 6) 1개, 성충 특이 band(No. 9) 1개가 존재함이 확인되었다(Table 2). 또한 발생시기에 관계없이 항상 나타나는 band(No. 1, 2, 7, 8)도 4개가 확인되었고, 이 esterase isozyme들은 2개의 carboxylesterase와 2개의 cholinesterase로 분류되었으며, 화랑곡나방의 전반적인 생리기능 및 신경전달 체계를 조절하는 중요한 효소인 것으로 사료된다. 억제제 특이성을 기준으로 화랑곡나방의 총체 esterase를 3종류로 분류한 바, 전 발생단계를 기준으로 12개의 esterase isozyme중 carboxylesterase가 7개로 가장

많은 비율로 존재하였고, cholinesterase가 2개, 그리고 arylesterase는 3개가 각각 존재함이 확인되었다(Table 3, Fig. 2).

결 론

화랑곡나방(*Plodia interpunctella* Hübner)의 발생과 변태 과정의 esterase(EST) isozyme의 활성과 전기영동에 의한 band pattern 변화 및 억제제(Eserine, p-HMB, Paraoxon, DDVP, DFP) 특이성에 의한 isozyme의 분류와 조성의 변화상을 확인하였다. 총체의 esterase(EST) 활성도는 발생단계별로 많은 차이를 보였으며, 성충 3일에 효소 활성이 가장 높았고, 전용시기에 가장 낮은 것으로 확인되었다. 전 발생단계에 있어서 총 12개의 esterase isozyme들이 존재하였는데, 높은 활성을 나타내는 band들은 주로 gel의 중앙 부위에서 관찰되었다. 억제제 특이성을 기준으로 12개의 esterase isozyme들은 carboxylesterase(CE), cholinesterase(ChE), arylesterase(ArE)의 3종으로 분류되었으며, 이중 CE가 7개, ChE가 2개 그리고 ArE가 3개임이 각각 확인되었다.

감사의 말씀

이논문은 1997년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

Ahmad, S. (1976) Larval and adult housefly carboxylesterase: Isozymatic composition and tissue pattern. *Insect Biochem.* 6: 541-547.
 Ahmad, S. and A. J. Forgash (1976) Nonoxidative enzymes in the metabolism of insecticides. *Drug. Metab. Rev.* 5: 141-164.
 Brigel, H. (1972) Nonspecific esterases in females of *Aedes aegypti*(L.). *Experimenta.* 28: 1166-1168.
 Devonshire, A. L. (1977) The properties of a carboxylesterase from the peach-potato-aphid,

Myzus persicae(Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.* 167: 675-683.
 Eguchi, M. and T. Sugimoto (1965) Changes in esterase zymograms in the silkworm, *Bombyx mori* L., during development. *J. Insect Physiol.* 11: 1145-1149.
 Freyvogel, T. A., R. L. Hunter and E. M. Smith (1968) Nonspecific esterases in mosquitos. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 765-790.
 Gadallah, A. I. and N. Marei (1973) Changes in soluble protein, dehydrogenases, and esterases of unfertilized and fertilized eggs of *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 3: 163-169.
 Geering, K. and T. A. Freyvogel (1974) The distribution of acetylcholine and unspecific esterases in the midgut of female *Aedes aegypti* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 49B: 775-784.
 Hideaki, H. and K. Ozaki (1983) Electrophoretic esterase patterns in the brown planthopper *Nilaparavata lugens* Stal(Hemiptera: Delphacid-ae) which developed resistance to insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* 18: 52-58.
 Kai, H., T. Kawai and Y. Kawai (1987) A time-internal activation of esterase A₄ by cold: Relation to the termination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 17: 367-372.
 Kapin, M. A. and S. Ahmad (1980) Esterases in larval tissues of gypsy moth, *Lymantria dispar*(L.); Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.* 10: 331-337.
 Kuhn D. and E. Heyman (1982) Identification of chloramphenicol hydrolyzing enzyme of guinea pig liver as one of the nonspecific carboxylesterase. *Biochem. Pharmac.* 31: 781-786.
 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.

- Laufer, H. (1961) From of enzymes in insect development. *Ann. W. Y. Acad. Sci.* 94; 825-835.
- Matthiensen, A., E. Tellechea and J. A. Levy (1993) Biochemical characterization for the genetic interpretation of esterase isozymes in *Micropogonias furnieri*(Pisces, Sciaenidae) in south Brazil. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B; 349-352.
- Mounter, L. A. and V. P. Whittaker (1953) The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases and other esterases. *Biochem. J.* 54; 551-559.
- Oppenoorth, F. J. (1985) Biochemistry and genetics of insecticidal resistance. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut, G. S. and L. G. Gilbert), Vol. 12 p. 731-756.
- Ozaki, K. and H. Koike (1965) Naphthyl acetate esterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler, with special reference to the resistant colony of the organophosphorus insecticide. *Appl. Entomol. Zool.* 9; 53-59.
- Randall, L. D. and J. C. William (1986) Characterization of cholinesterase activity in larval *Chironomus riparius* Megen. *Insect Biochem.* 16; 733-739.
- Sudderuddin, K. I. and H. H. Tan (1973) Some hydrolase and their involvement in insecticide resistance. *Pesti. Art. News. Summ.* 19; 24-35.
- Van Der Geest, L. P. S. and F. H. M. Borgsteede (1969) Protein changes in the haemolymph of *Piers brassicae* during the last larval instars and the beginning of the pupal stage. *J. Insect Physiol.* 15; 1687-1963.
- Xu, G. and D. L. Bull (1994) Acetylcholinesterase from the horn fly(Diptera: Muscidae) II. Biochemical and molecular properties. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 27; 109-121.
- Yoo, C. M., S. E. Jeong, H. Y. Kim and H. Y. Ko (1993) Isozymatic composition of haemolymph esterase and its ontogeny in *Lucilia illustris*. *Korean J. Entomol.* 23; 49-55.