

누에의 특정좌위 돌연변이를 이용하는 변이원 검색계의 피검누에게통 선정 및 변이원 감수성

김삼은 · 안미영 · 윤형주 · 김종길 · 최지영
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

A Screening System for Environmental Mutagens by Means of Specific Locus Mutation of the Silkworm, *Bombyx mori*

Sam Eun Kim, Mi Young Ahn, Hyung Joo Yoon, Jong Gill Kim and Ji Young Choi

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of
Agriculture and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea
(Received November 24, 1999)
(Accepted January 12, 2000)

ABSTRACT: A mutagenicity testing system using a specific locus mutation of *Bombyx mori* was introduced from National Institute of Genetics in Japan. In the system, mutagenicity could be detected by the egg colour manifested by the *pe* and/or *re* genes, which is a kind of recessive visible mutation of the insect. The efficiency to detect mutagenicity of the system was examined and improved. To promote the sensitivity of the system to mutagens, eight varieties of *Bombyx mori* were tested for their sensitivity to two mutagens, EMS and MMC. Two varieties of the silkworm, N12 and C5, were finally selected as the most sensitive ones. The most sensitive developmental stage of the silkworm to mutagens was mid and late pupal stages for female and male, respectively. The system will be applied to test unknown mutagens after some more detail examination about its sensitivity.

Key Words: Mutagenicity, *Bombyx mori*, Specific locus mutation, Egg colour

I. 서 론

산업화와 더불어 각종 환경변이원 물질에 의한 발암 및 기형아 출산 등 변이원성 질환이 날로 증가 일로에 있다 (Cooper와 Grover, 1990). 이러한 질병의 원인물질을 규명하기 위하여 OECD는 유전독성 시험 지침에 따라, 유전자 돌연변이시험 6종, 염색체 이상시험 6종, DNA 손상시험 3종 중 각 1종씩, 3종의 조합시험을 거쳐 발암물질을 검색하도록 추천하고 있다(黒田, 1995). 이와 같은 조합시험을 추천하고있는 이유는 각 검색계 마다 비용, 신속성, 검색 스펙트럼, 인간에의 적용범위 등 여러 면에서 나름대로의 장단점을 보이고 있으나, 모든 면에서 공통적으로 우수한 단일 검색계가 아직 존재하지 않기 때문에, 현재 각 검색계 별로 효율성을 증진시키기 위한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

현재 주로 이용되고 있는 화학물질의 변이원성 시험법으로는 미생물을 이용하는 Ames test(Gee 등, 1994; Maron과 Ames, 1983)와 *in vitro* 수준에서 염색체 이상을 검출하는 염색체 이상시험(Dean과 Danford, 1984) 및 *in vivo*에서 염색체 손상을 검출하는 소핵시험(Hayashi 등, 1990) 등이 있다.

이 중에서 Ames test는 살모넬라균의 복귀 돌연변이를 이용하여 변이원성을 검색하므로 간편하고 비용이 저렴하다는 장점이 있으나, 원핵 생물을 대상으로 하기 때문에 염색체 돌연변이를 검출할 수 없다는 근본적 문제점을 안고 있다. 한편 배양세포(CHO/CHL 세포주 등)를 이용하는 변이원성 검색계는 인간세포를 이용할 수 있다는 장점이 있는 반면에 배양기내의 세포가 배수성을 나타내는 등 그 핵형이 비정상이라는 문제점이 있다. 또한 포유류 검색계는 얻어진 결과를 인간에게 적용하기에 가장 적절한 시험계이지만, 1-2년 기다려야 결과를 알 수 있고 실험동물의 사육 관리에 막대한 비용이 소요된다는 단점이 있다. 이러

¹To whom correspondence should be addressed

한 문제점을 보완하기 위한 수단으로, 원핵생물과 포유류를 연결할 수 있는 중간 위치에 있는 곤충계를 이용하는 검색 방법이 있다(黒田, 1989; 村上, 1983).

곤충 중에서는 초파리(*Drosophila melanogaster*)가 유전 독성 검색에 주로 이용되고 있는데, 초파리는 유전학적으로 많은 연구가 축적되어 있을 뿐 아니라 1세대 소요 기간이 약 10일에 불과하여 단기간 내에 시험결과를 확인할 수 있는 많은 장점이 있다(Wurgler와 Vogel, 1985). 그러나 생존기간이 짧다는 것은 잠복기가 긴 화학물질의 독성 검사에는 부적합한 단점으로도 작용할 수 있으며 초파리는 크기가 매우 작아서 가장 기본적 약제투여 방법인 주사법을 적용하기 어렵다는 단점도 있다.

한편 누에를 이용하는 변이원성 검출계도 있는데(Tazima, 1978), 그 기작은 흑색란을 산란하는 야성형 누에에 변이원을 투여하여 marker인 *pe·re*를 호모로 갖는 개체와 교배시킨 후 변이원에 의해 유발된 돌연변이를 백란(*pe*)과 적란(*re*)의 출현율로 검색하는 것이다. 누에는 대규모 사육이 용이하고 실험하기에 적당한 크기이며, 다른 포유류 동물인 쥐나 원숭이와는 달리 인체에 병원균(예: 쥐; 한탄 바이러스, 원숭이; ADIS 바이러스)을 전염시킬 염려도 없을 뿐 아니라 알과 유충의 색깔로 돌연변이를 가시적으로 쉽게 구별할 수 있고 인간에 의해 오랜 세월동안 사육 관리 되어오면서 그 유전형질이 자세히 분석되어 있다는 점 등 변이원 검색에 많은 장점을 갖고 있다.

본 연구는 위와 같은 장점이 있는 누에 검색계를 일본 국립유전학연구소로부터 도입하여, 국내 보유 누에계통 중에서 변이원에 대해 감수성이 높은 누에 계통을 선정하고 변이원 투여에 적합한 누에의 발육시기를 검토하는 등, 검색 효율성을 높임으로써 미생물, 배양세포 및 포유류를 이용하는 기존 검색계의 단점을 보완할 수 있는 새로운 검색계로서의 활용 가능성을 검토하는 데 그 목적을 두고 행해졌다.

II. 실험재료 및 방법

1. 누에알의 색깔로 변이원성을 검색하는 기작

*pe*와 *re*는 각각 제 5번 염색체의 0.0과 31.7의 위치에 좌위하는 알색에 대한 열성가시 돌연변이 유전자로, *pe* 호모형은 흰 알이 되고 *re* 호모형은 붉은 알이 되는데 *pe*가 *re*의 우위에 있으므로 *pe·re*를 동시에 호모로 갖는 개체는 흰 알이 된다. 야성형(*pe⁺·re⁺*)의 알색은 검은색으로 *pe·re*에 대해 우성이다. 누에의 알색으로 변이원을 검색하는 방법은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 검은 알을 낳아야 할 야성형(*pe⁺·re⁺//pe⁺·re⁺*) 누에에 변이원을 투여한 후, 흰 알을 낳는 *pe·re//pe·re* 형의 누에와 교배시킨다. 야성형

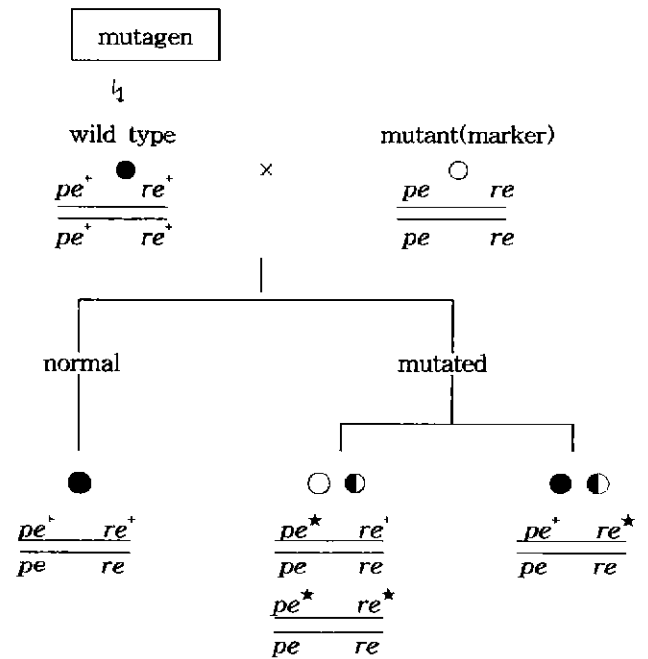


Fig. 1. Schematic explanation to detect a mutagen by the specific locus method using the egg-colour mutants in *Bombyx mori*. ★; gene mutation, ●; black egg, ○; white egg, ●; red egg, ○; white mosaic egg, ○; red mosaic egg.

누에의 *pe⁺*와 *re⁺*에 아무 변화가 없을 때는 그 F1은 *pe⁺·re⁺//pe·re* 형이 되어 흑색란이 되지만 *pe⁺* 단독 또는 *pe⁺·re⁻* 양 좌위에서 동시에 돌연변이가 일어났을 경우에 F1은 *pe^{*}·re⁺//pe·re* 또는 *pe^{*}·re^{*}//pe·re* 형이 되어 백색란이 된다(편의상 돌연변이가 유발된 유전자는 *로 표시함). 마찬가지로 *re⁺* 좌위에 변이가 일어났을 경우에는 *pe⁺·re^{*}//pe·re*가 되어 F1은 적색란이 된다. 따라서 흰 알과 붉은 알의 출현 빈도로 투여한 변이원의 변이유발 빈도를 산출할 수 있다.

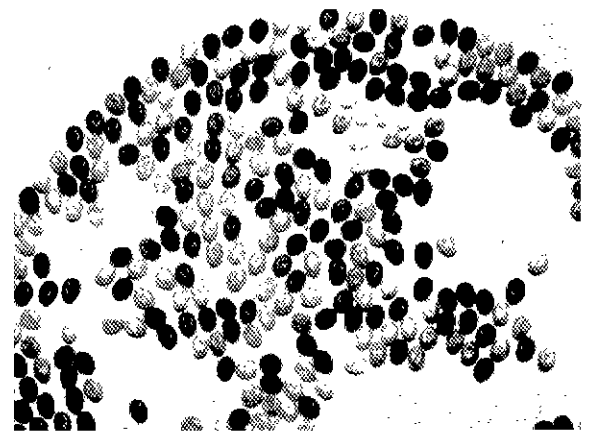


Fig. 2. Egg-colour mutation in *Bombyx mori*. Mutagens are detected by the visible egg-colours manifested by the genes, *pe* and/or *re*. black egg, wild type, white egg: *pe* mutant, red egg: *re* mutant.

누에 알의 흑색란, 백색란, 적색란을 예시하면 Fig. 2와 같다. 이 그림은 변이원을 처리하여 얻어진 결과가 아니고 야성형 누에와 *pe·re* 호모형 누에를 교배시켜 얻은 F₂로서 단지 누에 알 색의 변이상을 예시할 뿐이다.

2. 변이원 감수성이 높은 누에계통의 선정

누에 계통은 고지키, 백안E^a, 잠107, 잠123, N12(이상 일본종), C5, C10, C108, 잠124, 잠108, P50(이상 중국종), 로모구아, 산슈리안(이상 유럽종), 한삼면, 선3호(한국종), HM(열대종) 등 16계통 중에서, 1차 예비실험(김 등, 1997)을 통하여 변이원 감수성이 비교적 높은 계통으로 선정된 고지키, N12, 잠107, C108, C5, 산슈리안, 한삼면, 선3호 등 8계통을 공시하였다. marker로는 *pe·re·ch* 호 모계통을 사용하였다.

변이원은 Ethylmethanesulfonate(EMS)(Sigma Co., St. Louis, USA)와 Mitomycin C(MMC)(Sigma Co., St. Louis, USA)를 공시하였다. EMS는 0.1% 수용액으로 하여 두당 10 µl를, MMC는 두당, 1 µg씩을 10 µl 용량으로 주사하였다.

3. 변이원 투여시기별 돌연변이 빈도 조사

4령 2일째, 5령 3일째, 번데기 3일째, 8일째, 11일째의 N12(♀)와 C5(♂) 각각 200두에 MMC(1 µg/10 µl/두)를 주사한 후 우화율을 조사하고, marker인 *pe·re·ch*와 교배시켜 정상산란 나방비율을 조사하였다. 우화율은 공시한 5령 유충수에 대해 사육 후 얻어진 나방수의 비율로 나타내었다. 채종한 누에알에 대해서는 산란 후 1~2개월 후 난색 특정 좌위 돌연변이 빈도를 조사하였다

4. 가스접촉법에 의한 변이원 투여법 검토

밀폐 가능한 플라스틱 용기(25×18×15 cm) 내에 4령 2

일째, 5령 3일째, 번데기 8일, 번데기 11일째의 N12 암수 각 100두씩을 넣고 실험구별로 10시간 동안 safety cabinet 내에서 EMS 가스에 접촉시킨 후 우화를 기다려 *pe·re·ch*와 교배 후 채종하여 돌연변이 빈도조사를 행하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 강건성과 산란성이 우수한 누에 계통의 선정

검색대상이 될 개체수가 적어도 천에서 만 단위를 요구하는 변이빈도 산출 시험의 특성상, 변이원 검색제로 이용할 누에는 사육하기 쉽고 알을 많이 낳으면서, 동시에 변이원에 대한 감수성이 높은 계통이 유리하다. 이에 1차 예비실험을 통하여 변이원 감수성이 상대적으로 높다고 판단된 8개 공시계통에 대하여 우화율, 정상산란 나방비율, 산란수, 수정율 등을 조사하여 그 성적이 양호한 계통을 변이원 검색 적합계통으로 선발하였다. 우화율은 누에의 강건성을 나타내는데, 우화율이 94% 미만인 계통은 선발대상에서 제외시켰다. 정상산란 나방은 한 마리의 산란수가 200개 이상인 동시에 산란된 알의 50% 이상이 수정된 개체를 기준으로 정하였는데 정상산란 나방비율이 80% 미만인 계통 역시 선발대상에서 제외시켰다. 마찬가지로 나방당 산란수 500개 미만, 수정율 90% 미만인 계통을 제외시킨 후 6개 조사 항목 중 합격 항목수가 5개 이상인 N12, C108(각 5개 항목) 과 C5(6개 항목)를 변이원 검색에 적합한 계통으로 선정하였다(Table 1).

2. EMS와 MMC에 대한 자웅별 생식세포의 변이원 감수성

8개 공시계통 누에의 자웅별 생식세포의 변이원 감수성을 확인하기 위하여, EMS와 MMC에 의한 변이우발 빈도를 조사하였다. 변이원 투여는 Tazima (1978)에 따라, 난모세포를 대상으로 할 때는 난각이 분비되기 직전인 우화

Table 1. Selection of the proper silkworm varieties for mutagen screening test by datum points^{a)} of a few characteristics

Varieties	Eclosion rate (%)		Rate of moth to lay eggs normally ^{b)} (%)	No. of eggs layed	Fertility (%)		No. of passed item	Selected
	Female	Male			Female	Male		
Kojiki	91	95	70	416	97	97	3	-
N12	94	96	71	578	94	95	5	+
Jam107	82	97	66	437	97	96	3	-
C108	97	100	73	527	97	97	5	+
C5	97	98	84	560	97	99	6	+
Sun3ho	81	79	86	334	96	96	3	-
Hansammyon	90	97	75	445	99	98	3	-
Sansurian	87	85	89	522	96	96	4	-

^{a)}Datum point to pass in each item: 94% for the rate of eclosion or fertility; 80% for the rate of moth to lay eggs normally; 500 eggs for No. of eggs layed.

^{b)}Moth to lay eggs normally is defined to the female moth layed more than 200 eggs, and which eggs hatched over 50%.

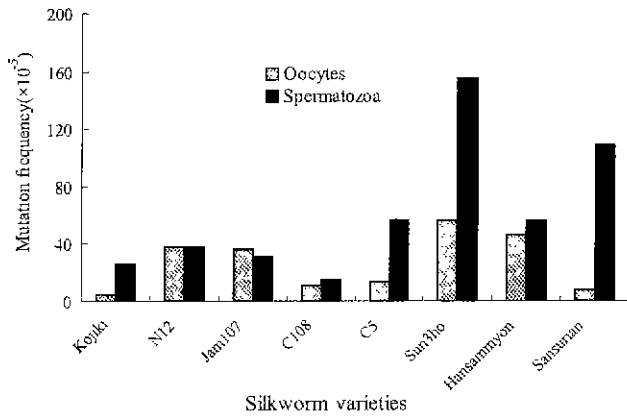


Fig. 3. Mutation frequency by EMS in 8 varieties of *B. mori*. Mutation frequency was obtained from the sum of *pe*- and *re*-mutant

5일전(화용 8일째)의 암컷에 주사하고, 정세포를 대상으로 할 때는 우화 1일전의 수컷에 주사하였다. 변이원을 투여한 야성형(*pe*⁺*re*⁻/*pe*⁺*re*⁺) 개체가 우화한 후 *pe*⁻*re*/*pe*⁻*re* 개체와 교배시켜 산란된 알의 색깔로 변이빈도를 산출하여 그 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 나타냈다. 우선 누에 계통간의 변이원 감수성을 비교해 보면 변이원의 종류에 따라 달랐지만 8개 공시계통 중에서 대체로 선3호의 변이빈도가 가장 높게 나타났다. 그러나 Table 1에서 나타낸 바와 같이 선3호는 우화율이 가장 낮고 산란수 또한 334립에 지나지 않아 변이원 검색계통으로 이용하기에는 곤란한 점이 많다. 이러한 점에서 누에의 강건성과 산란성을 기준으로 하여 선정한 N12, C108, C5를 대상으로 EMS와 MMC에 대한 감수성을 비교한 결과, N12와 C5가 C108보다 높은 값을 보였기에 이 두 계통을 변이원 검색에 적합한 것으로 최종 결정하였다.

한편, EMS와 MMC에 대한 반응은 자웅 생식세포간에 큰 차이를 보였다. 즉 EMS의 경우에는 대부분 정세포 쪽이 난모세포보다 변이빈도가 높거나 비슷한 값을 나타내

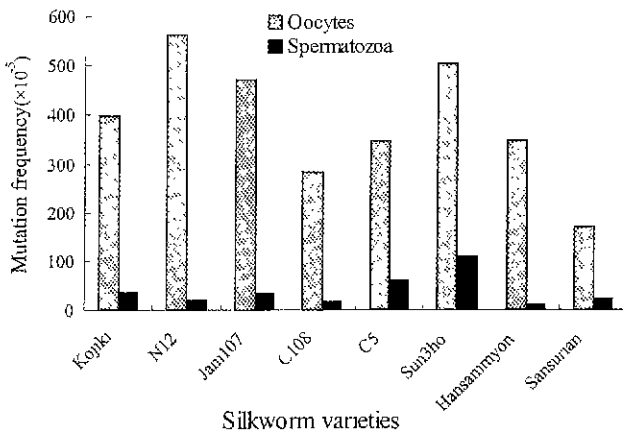


Fig. 4. Mutation frequency by MMC in 8 varieties of *B. mori*. Mutation frequency was obtained from the sum of *pe*- and *re*-mutant.

었는데 비해(Fig. 3), MMC를 주사한 경우에는 모두 난모세포 쪽이 정세포 보다 5~20배의 월등히 높은 값을 보였다(Fig. 4). 즉 정세포에서는 10~100×10⁵ 정도의 낮은 변이빈도를 보인데 비하여, 난모세포에서는 180~570×10⁵ 정도의 높은 변이빈도를 나타내었다.

이와 비슷한 결과는村上(1984)에 의해서도 확인된 바 있다. 그는 암수번데기에 EMS와 MMC를 투여한 후 무처리 개체와 교배시켜 얻어진 알의 부화비율을 조사하였다. 그 결과 EMS의 경우에는 주사한 개체의 자웅에 관계없이 차세대 알의 부화비율이 비슷하였는데, MMC의 경우에는 응성 생식세포는 그 치사율이 미미하였지만(10 μg 주사로 10% 치사), 자성 생식세포는 5 μg 주사로 99% 치사하는 막대한 장애를 받았다.村上(1983)는 EMS와 MMC에 대한 자웅 생식세포의 이러한 차이를 누에 대사회에서는 EMS가 직접변이원으로 작용하는데 반해 MMC는 간접변이원으로 작용하기 때문인 것으로 생각하고 있다. 대부분의 동물 생식세포가 그러하지만 특히 누에 생식세포의 경우에도 정자는 세포질이 거의 없이 핵물질이 대부분으로 구성되어 있는데 비하여 난모세포 또는 난자는 핵질에 비하여 막대한 양의 세포질로 구성되어 있고, 그 세포질 내에 물질 대사에 관여하는 각종 효소가 함유되어 있는 것으로 알려져 있어村上의 주장을 수료할 만하다고 생각된다. 그러나 일반적으로 MMC는 직접변이원으로 알려져 있는 물질이므로, 누에알의 특징적 반응에 대해서는 금후 더 자세한 검토가 이루어져야 할 것으로 보인다.

3. 변이원의 처리시기별 돌연변이 빈도 조사

4령, 5령. 번데기 3일, 번데기 8일, 번데기 11일째의 N12 암누에와 C5 수누에에 MMC(1 μg/두)를 투여하였다. 그 결과 우화율, 산란수, 불수정란의 비율은 처리시기별로 별

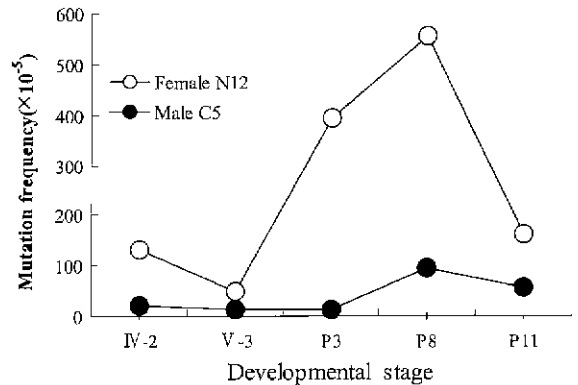


Fig. 5. Changes in mutation frequency with the MMC-treated stages. IV-2, the second day of 4th instar larvae; V-3, the third day of 5th instar larvae; P3, the third day after pupation; P8, the eighth day after pupation; P11, the eleventh day after pupation.

차이를 보이지 않았지만(김 등, 1998), 돌연변이 빈도는 암 누에에서는 변태기 초중기, 수누에에서는 변태기 중말기에 높은 값을 보였다(Fig. 5). 즉 N12 암번데기의 경우에는 변태기 3일째에 394×10^{-5} , 변태기 8일째에 566×10^{-5} 이었고, C5 수번데기에서는 8일째에 91×10^{-5} , 변태기 11일째에 56×10^{-5} 으로 기존의 발표(Tazima, 1978)와도 일치하는 것이다.

4. 가스접촉법에 의한 변이원 투여법 검토

변이원이 휘발성 물질인 경우에는 피검체에 일일이 주사법으로 변이원을 투여하는 것보다 수십~수백 마리를 한 단위로 하여 가스상태로 흡입시키는 것이 작업 노력 면에서 훨씬 유리하다고 볼 수 있다. 이에 가스상태로 변이원을 투여한 누에에서도 변이가 유발되는 지를 확인하기 위하여 밀폐된 플라스틱 상자내에 누에 100두씩을 넣어 10시간 동안 EMS 가스와 접촉시킨 결과, 4~5령기의 누에에서는 *pe* 및 *re* 돌연변이가 거의 유발되지 않았지만 암번데기 8일째 및 수번데기 11일째에는 각각 317×10^{-5} 의 변이가 유발되었다(Fig. 6). 이 결과는 주사법으로 MMC를 투여한 Fig. 5의 결과와 매우 유사한 것으로, 휘발성 변이원은 주사법대신 가스접촉법으로도 투여할 수 있다는 것이 확인되었다. 가스 접촉법을 사용하면 작업 노력 면에서 크게 유리 할 뿐 아니라, 누에알이나 1~3령 누에 같이 그 크기가 작아서 주사 투여하기 곤란했던 개체에도 쉽게 적용할 수 있어, 아직까지 조사되지 못한 누에의 모든 발육시기에 대한 변이원 감수성을 비교 시험하는데도 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

이상의 결과로 금번 국내에 도입된 누에 알색 관련 특정 좌위 돌연변이 검출법이 변이원 검색에 유효하다는 것이 확인되었다. 한편, 누에 검색계에 알맞는 피검누에계통이

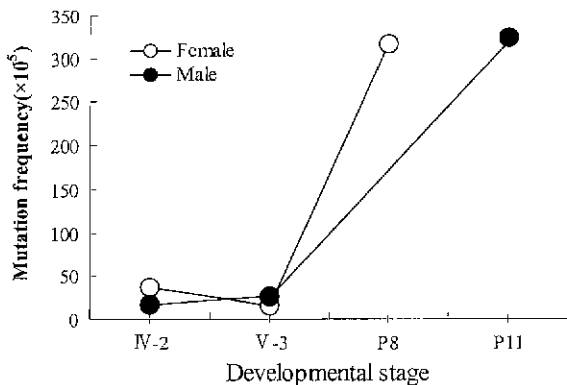


Fig. 6. Changes in mutation frequency with the EMS gas-treated stages in N12. Abbreviations are the same in Fig. 5.

선정되고, 변이원 투여에 적절한 누에 발육시기가 정해지는 등 검색계로써 갖추어야 할 기본 조사가 이루어 졌으나, 이 검색계가 변이원 검색현장에서 활용되기 위해서는 금후, 보다 다양한 변이원에 대한 감수성 조사가 수행되어 기존의 미생물이나 배양세포, 또는 포유류 검색계와의 검색 효율성에 대한 비교 검토가 이루어져야 하겠다.

참고문헌

Cooper, C.S. and Grover, P.L. (1990): Chemical carcinogenesis and mutagenesis I, Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-29.

Dean, B.J. and Danford, N. (1984): Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells in Mutagenicity Testing (Vemtt, S. and Parry, J.M. eds.), IRL Press, Oxford, pp. 187-232.

Gee, P. Maron, D.M and Ames, B.M. (1994): Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 11606-11610.

Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990): The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulonocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* **245**, 245-249.

김삼은, 진 한, 황석조, 양성렬 (1997): 곤충을 이용한 변이원 성 검출계 수립. 농촌진흥청 잠사곤충연구소, 1997년도 시험연구보고서. 277~285.

김삼은, 안미영, 김종길, 양성렬 (1998): 곤충을 이용한 변이원 성 검출계 수립. 농촌진흥청 농업과학 기술원(잠사곤충부편), 1998년도 시험연구사업보고서, 247~263.

黒田行昭 (1989): 動物遺傳學實驗法, 共立出版, 日本, pp. 124-151.

黒田行昭 (1995): 抗變異原・抗發がん物質とその檢索法, 講談社サイエンティフィック, 日本, pp. 259-277.

Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.

村上昭雄 (1983): 昆虫を用いた環境化學物質の變異原テストの特色, 環境變異原研究, **5**, 12-21.

Murakami, A. (1984): Dose-response relationships for mutation induced by chemicals in the silkworm. *Problems of theshold in chemical mutagenesis*, 5-13.

Tazima, Y. (1978): Mutagenicity testing of environmental chemicals in *The silkworm: an important laboratory tool*. Kodasha Ltd, Tokyo, pp. 247-268.

Wurgler, F.E. and Vogel, E.W. (1985): *In vivo* mutagenicity tests using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in *Chemical Mutagens* (F.J. de Serres, eds), Pleum Press, New York, pp. 1-72.