

## 신돌연변이잡 *cre*(반월형란)의 유전자 연관분석과 유전형질

홍선미 · 노시갑  
경북대학교 농업생명과학대학

### Genetic analysis and characteristics in the crescent-egg mutant, *cre*, of *Bombyx mori*.

Sun Mee Hong and Si Kab Nho  
College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University

#### ABSTRACT

The "crescent-egg" a new spontaneous mutant was detected in a white egg strain k37. Studies were carried out the linkage analysis, to investigate phenotypic characteristics and biochemical analysis of haemolymph and ovarian protein. The mutant, *cre* was independent from 20 linkage groups *P*(2), *Ze*(3), *L*(4), *oc*(5), *st*(8), *Ia*(9), *w-I*(10), *K*(11), *ch*(13), *U*(14), *bl*(15), *cts*(16), *bts*(17), *mln*(18), *nb*(19), *oh*(20), *Lan*(21), *or*(22), *tub*(23) and *Xan*(27). The fertilization, hatchability and larval growth were not different from the those of normal eggs. The content and composition of yolk protein were similared to normal eggs. Scanning electron microscopy revealed the areal specific structure in dorsal region of egg-shell of *cre* mutant. Analysis of chorion protein by isoelectrofocusing(IEF), was resolved no difference in the composite of the chorion protein. We conclude that the egg mutant *cre* is expressed only in the egg-shape formation and region specific determination.

**Key words :** New spontaneous mutant, Egg-shape, Linkage analysis, Genetic characteristics, *Bombyx mori*

#### 서 론

가잠에는 난형질에 관한 다수의 변이체가 알려져 있으며, 이들 대부분은 난형이상과 난색변이에 관한 것으로 나눌 수 있다(Doira, 1983). 난형이상과 관련된 변이체는 모두 난형성과정에서의 이상에 기인하는 것으로 대란(*Ge*), 소형란계(*sm*, *sm-2*, *sm<sup>n</sup>*), 방추형란(*sp*), 타원형란(*elp*), 신장형란(*ki*), 왜소란(*emi*) 등이 있다(Doira *et al.*, 1992).

본 대학 곤충유전자원학 연구실에 보존중이던 1계통으로부터 난형이상란이 혼재된 아구를 발견하였다. 이 후 이상란이 산란된 아구를 선발·고정하여 난형이상계통으로 확립하였다. 난의 모양으로부터 유전자명을 반월형란(crescent egg)이라 하고 유전자기호를 *cre*로 명명하였다(홍등, 1998).

난형성과정의 최종단계에서 포란세포에 의해 형성되는 난각은 난모세포의 외측을 둘러싸는 탄력성이 있는 막으로 난 내용물의 보호와 gas교환 및 정자의 침입에 필요한 복잡한 구조와 생리작용을 가지고 있다(Kafatos *et al.*, 1977).

난각형성과정에서 포란세포로부터 분비된 chorion단백질은 난표면에 집적되어 일정한 형태로 구축되고(Sander

*et al.*, 1985), 이 과정에 의해 특유의 난형과 난각구조가 형성된다. 가잠에는 난각형성과정에서의 이상에 의해 초래되는 다수의 난형이상 변이체들이 알려져 있는데 이들은 난각형성의 특정시기에 발현되는 유전형질들로서 유전자의 시기특이적 및 조직특이적인 발현기구를 밝히는 좋은 연구재료가 되고 있다(Nadel, 1980; Regier, 1982).

지금까지의 연구에 의해 반월형란(*cre*)은 1개의 열성유전자에 의해 발현되는 새로운 돌연변이 유전자인 것이 확인되었으며(홍등, 1998), 현재 *cre*유전자의 소속연관군과 유전자 좌위를 밝히기 위한 연구가 수행 중에 있다. 본 연구는 지금까지 수행된 유전자분석 연구의 결과와 더불어 *cre*유전자의 정확한 유전형질에 대해 조사분석을 실시한 것이다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 공시 누에계통

반월형란(이하 *cre*란)은 본 대학 곤충유전자원연구실에 보존중이던 k37 누에계통으로부터 발견된 자연돌연변이체이다. 1989년 사육에서 정상란과 변이란이 혼재된 아구

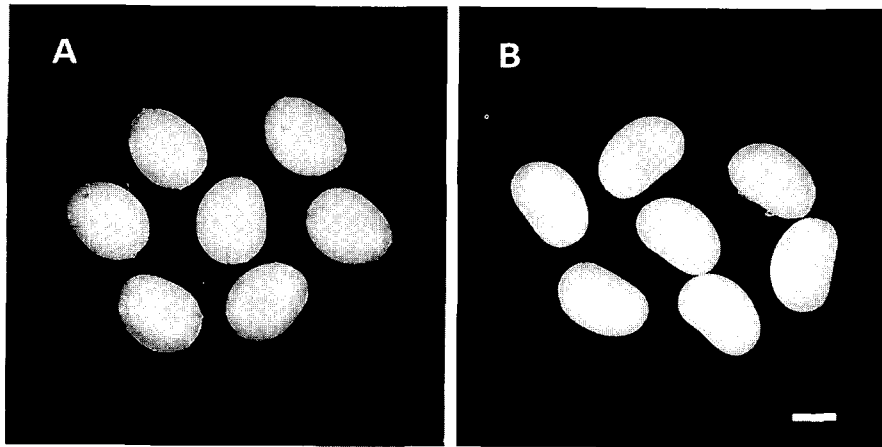


Fig. 1. Feature of the normal and cre mutant eggs. A, normal; B, cre mutant. Scale bar = 5 mm

를 발견한 후, 이로부터 난형이상계통을 분리하였다(그림 1). 1990년 선발, 고정된 계통으로부터 12아구를 교배한 결과, 정상란과 이상란이 각각 약 3 : 1의 비율로 분리되었다. 이후 이상란 아구만을 교배하여 계대하였으며, 1993년 정상란이 완전히 제거된 난형이상란 계통을 확립하였다. 실험재료는 연관분석에 사용한 계통으로부터 분리된 정상란과 cre란을 사용하였다.

## 2. 연관분석

연관분석에 사용한 표지유전자를 연관군별로 보면 *P*(2), *Ze*(3), *L*(4), *oc*(5), *st*(8), *Ia*(9), *w-1*(10), *K*(11), *ch*(13), *U*(14), *bl*(15), *cts*(16), *bts*(17), *min*(18), *nb*(19), *oh*(20), *Lan*(21), *or*(22), *tub*(23), *Xan*(27)으로 총 20개 연관군이다. 표지형질이 열성일 경우에는 F<sub>2</sub>세대, 우성일 경우에는 F<sub>1</sub>암컷에 cre란 계통의 수컷 homo를 교배(BF<sub>1</sub>)한 교배구의 분리비를 조사하여 유전자의 연관유무를 검정하였다.

## 3. 조사항목

### 가. 난의 크기, 부화율, 조란수 및 난소중

정상과 cre homo 성충 각각 20두로부터 완성란을 채취하여 실체현미경하에서 사진촬영하여 장경과 단경을 구하였다. 부화율은 수정난수에 대한 부화난수의 비율이며 각각 30아구를 조사하여 평균값을 구하였다. 용화 1일, 3일, 5일, 7일 및 9일째의 번데기 체중은 암·수 각각 20마리씩을 측정하였으며 측정 후 난소(혹은 난소란)를 적출하여 무게를 측정하였다.

### 나. 난황단백질 분석

#### 1) 정량분석

용화 1일, 3일째에는 난소 전체를, 용화 5일, 7일 및 9일째에는 난소소관의 기부로부터 난소란을 채취하였다. 단백질 정량분석은 Lowry 방법에 준하였으며(河口, 1984),

Beckman DU-650(USA) spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovin serum albumin을 표준단백질로 하여 검량곡선을 작성하고 실제농도로 환산하였다.

#### 2) Native 및 SDS-PAGE

6.5% polyacrylamide gel을 지지체로, Tris-Glycine 용액을 영동용 완충액으로 사용한 slab gel 전기영동을 실시하였다. 영동 후 0.1% C.B.B(R-250)로 단백질을 염색하였으며 acetic acid 용액으로 탈색하였다. 난소(난소란)을 SDS sample buffer(1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl(pH 6.8), 20% glycerol)로 조정된 후 0.1% SDS를 포함하는 10% polyacrylamide gel로 전기영동을 실시하였다(Laemmli, 1970). 단백질은 C.B.B(R-250)으로 염색하였으며, 영동이 끝난 gel은 Kaiser Image Analyzer(Vilber Lourmant, Germany)를 사용해서 각각의 성분에 대한 상대적인 농도를 계산하였다.

#### 다. 난각구조의 관찰

정상란과 cre란의 암나방으로부터 완성란을 채취하여 carnoy액에 고정(-25°C, 24 hr)한 후 alcohol계에서 탈수하였다. propylene oxide : isoamylacetate(1 : 1)에서 4 hr 처리 후 100% isoamylacetate로 치환하였다. 임계점 건조장치(Hitachi HCP-2)로 건조한 후 gold coating하여 난각표면 구조를 관찰하였다. Hitachi S-2300 주사전자현미경을 사용해 가속전압 10~15 kV, 400~1000배로 관찰하였으며, 관찰부위는 정공부, 후극부, 측면부, 복면부 및 배면부이다.

#### 라. Isoelectrofocusing (IEF)

완성란을 마쇄하여 난내용물을 완전히 제거한 후 ethanol : ethyl ether(1 : 1)로 수분을 제거하였다. 채취한 각각의 난각을 sample buffer(6 M Urea, 0.05 M Tris-HCl(pH 9.0), 0.01 M Lysine, 0.01 M EDTA, 0.07 M DTT)에 용해시켜 원심분리한 후 상청부를 영동용시료로 사용하였다. 2% carrier ampholine(Pharmalyte(pH 4-6), Sweden)로 pH gra-

dient를 형성한 5% polyacrylamide gel를 지지체로 한 등전점 전기영동을 실시하였다. 영동은 100 V 2 hr, 200 V 2 hr, 300 V 20 hr 실시하였으며, 영동 후 10% TCA로 단백질을 고정 한 후 0.03% CBB(G250)로 염색하였다.

**마. 포란세포의 조직학적 관찰**

시료의 채취는 chorion 단백질이 분비되기 전, 분비 중 및 분비 말기의 3단계로 실시하였다. 용화 5일 및 7일째의 암번데기에 0.5% trypan blue 용액을 주사하고 6~12 hr 후에 난소를 적출하여 난소란의 염색정도에 따라 적당한 부위의 난관을 채취하였다(河口 等, 1987). 채취한 시료는 carnoy액에 고정하고(-25°C, 24 hr) alcohol계로 탈수한 후, paraffin으로 embedding하였다. Leica SM 2,000R(Germany) sliding microtome으로 두께 5~8 μm의 절편을 작성하고, alcohol, xylene계열로 deparaffin한 후 hematoxylin과 eosin으로 2중 염색을 하여 Nikon Optiphot-2(Japan) 광학현미경으로 관찰하였다.

**결 과**

**1. *cre* 유전자의 연관분석**

1989년 춘잠기에 백란계통 k37로부터 난형이 반달모양을 한 이상란이 혼재된 1아구를 발견하였다. 동일아구내에서 2-3세대에 걸쳐 상호교배를 한 결과 차대에 동일한 모양의 난이 지속적으로 출현하였으므로 난형이상은 유전적인 형질인 것이 확인되었다. 선발초기에는 1아구내에 정상난형과 반월형란이 혼재된 상태로 나타났으나 약 5-6세대에 걸친 선발과 도태의 결과 반월형란만을 산란하는 계통을 확립하였다. 반월형란과 정상란과의 교잡 F<sub>1</sub>에서는 정역에 관계없이 정상란이 산란되었으며, F<sub>2</sub>에서는 정상란과 반월형란 아구가 약 3:1로 분리하였다. 또한 반월형란 아구내의 성비에 의해 반성유전은 하지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 난형이 반달모양을 나타내는 이 변이체는 상염색체상에 존재하는 1개의 열성유전자에 의해 발현되는 새로운 돌연변이인 것이 확인되었다. 난의 형태로부터 유전자명을 반월형란, crescent egg로 명명하고 유전자기호를 *cre*로 하였다.

*cre* 유전자의 소속연관군을 밝히기 위하여 연관분석을 실시하였다. 분석에 사용한 표지유전자를 연관군별로 나타내면 P(2), Ze(3), L(4), *oc*(5), *st*(8), *la*(9), *w-1*(10), K(11), *ch*(13), U(14), *bl*(15), *cts*(16), *bts*(17), *mln*(18), *nb*(19), *oh*(20), *Lan*(21), *or*(22), *tub*(23), *Xan*(27) 등 20개 연관군에 대하여 검색을 실시하였다. 검색에 사용한 표지유전자가 우성일 경우에는 교잡 F<sub>1</sub>에 *cre* homo 수컷을 교배한 BF<sub>1</sub>에서, 열성일 경우에는 F<sub>2</sub>에서 나타나는 분리비를 조사하여 연관유무를 확인하였다. 표 1에 열성 표지유전자와의

**Table 1.** Linkage analysis of *cre* examined in F<sub>2</sub> generation

| Genes and linkage groups | Parental genotype           | Segregation of characters |     |                         |     | Remarks     |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------|
|                          |                             | <i>cre</i>                |     | + <sup><i>cre</i></sup> |     |             |
| <i>P<sup>M</sup></i> (2) | <i>P<sup>M</sup> cre/++</i> | <i>P<sup>M</sup></i>      | +   | <i>P<sup>M</sup></i>    | +   | Independent |
|                          |                             | 11                        | 129 | 7                       | 71  |             |
| <i>oc</i> (5)            | <i>oc cre/++</i>            | <i>oc</i>                 | +   | <i>oc</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 6                         | 31  | 48                      | 119 |             |
| <i>st</i> (8)            | <i>st cre/++</i>            | <i>st</i>                 | +   | <i>st</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 1                         | 1   | 4                       | 4   |             |
| <i>w-1</i> (10)          | <i>w-1 cre/++</i>           | <i>w-1</i>                | +   | <i>w-1</i>              | +   | Independent |
|                          |                             | 0                         | 2   | 2                       | 2   |             |
| <i>ch</i> (13)           | <i>ch cre/++</i>            | <i>ch</i>                 | +   | <i>ch</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 32                        | 150 | 33                      | 89  |             |
| <i>bl</i> (15)           | <i>bl cre/++</i>            | <i>bl</i>                 | +   | <i>bl</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 40                        | 100 | 17                      | 61  |             |
| <i>cts</i> (16)          | <i>cts cre/++</i>           | <i>cts</i>                | +   | <i>cts</i>              | +   | Independent |
|                          |                             | 52                        | 88  | 27                      | 51  |             |
| <i>bts</i> (17)          | <i>bts cre/++</i>           | <i>bts</i>                | +   | <i>bts</i>              | +   | Independent |
|                          |                             | 4                         | 1   | 7                       | 4   |             |
| <i>mln</i> (18)          | <i>mln cre/++</i>           | <i>mln</i>                | +   | <i>mln</i>              | +   | Independent |
|                          |                             | 3                         | 16  | 38                      | 19  |             |
| <i>nb</i> (19)           | <i>nb cre/++</i>            | <i>nb</i>                 | +   | <i>nb</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 9                         | 173 | 32                      | 90  |             |
| <i>oh</i> (20)           | <i>oh cre/++</i>            | <i>oh</i>                 | +   | <i>oh</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 17                        | 8   | 33                      | 18  |             |
| <i>or</i> (22)           | <i>or cre/++</i>            | <i>or</i>                 | +   | <i>or</i>               | +   | Independent |
|                          |                             | 41                        | 91  | 16                      | 69  |             |
| <i>tub</i> (23)          | <i>tub cre/++</i>           | <i>tub</i>                | +   | <i>tub</i>              | +   | Independent |
|                          |                             | 26                        | 106 | 16                      | 69  |             |

연관검색 결과를 나타내었다. 연관되었을 경우의 이론분리비 0:1:1:2를 만족하는 경우가 없었으므로 표 1에 나타난 표지유전자와는 모두 독립임이 확인되었다. 표 2에 우성 표지유전자와의 연관검색 결과를 나타냈다. 실험의 편의상 표지유전자에 대한 정상형질만을 조사하였으며 이때의 연관이론비는 0:1이다. 제 3연관군의 Ze와 연관 가능성을 의심 했지만 연관될 경우의 이론분리비인 1:0:0:1과는 다소 차이가 있었으므로 독립으로 판단하였다.

이상의 결과, 28개의 연관군 중에서 20개의 연관군과 독립이 확인되었으며 현재 나머지 연관군에 대한 연관검색이 진행중에 있다.

**2. 반월형란의 형질특성**

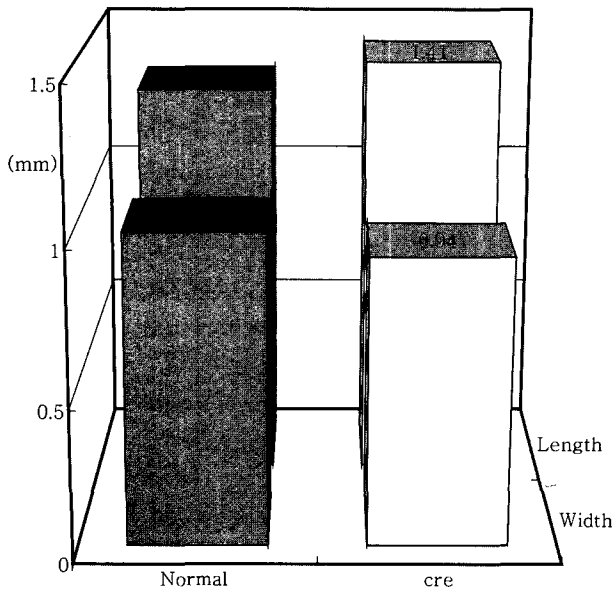
**가. 난의 크기와 모양**

정상란과 반월형란(*cre*)의 난의 크기와 형태를 비교하기 위하여, 난의 장경과 단경을 그림 2에 나타냈다. 정상란의 장경은 1.32±0.02 mm, *cre*란은 1.41±0.03 mm이었다.

**Table 2.** Linkage analysis of *cre* examined in BF<sub>1</sub> generation

| Genes and linkage groups          | Parental genotype   | Segregation of characters |    |                         |   | Remarks     |
|-----------------------------------|---|---------------------------|----|-------------------------|---|-------------|
|                                   |   | <i>cre</i>                |    | + <sup><i>cre</i></sup> |   |             |
| <i>Ze</i> (3)                     | ( <i>Ze</i> /+, +/ <i>cre</i> ) × (+/+, <i>cre</i> / <i>cre</i> )                 | <i>Ze</i>                 | +  | <i>Ze</i>               | + | Independent |
|                                   |   | 56                        | 38 | 0                       | 0 |             |
| <i>L</i> (4), <i>U</i> (14)*      | ( <i>L</i> /+, <i>U</i> /+, +/ <i>cre</i> ) × (+/+, <i>cre</i> / <i>cre</i> )     | +                         |    | +                       |   | Independent |
|                                   |   | 77                        |    | 69                      |   |             |
| <i>Ia</i> (9), <i>K</i> (14)*     | ( <i>Ia</i> /+, <i>K</i> /+, +/ <i>cre</i> ) × (+/+, <i>cre</i> / <i>cre</i> )    | +                         |    | +                       |   | Independent |
|                                   |   | 106                       |    | 13                      |   |             |
| <i>Lan</i> (21), <i>Xan</i> (27)* | ( <i>Lan</i> /+, <i>Xan</i> /+, +/ <i>cre</i> ) × (+/+, <i>cre</i> / <i>cre</i> ) | +                         |    | +                       |   | Independent |
|                                   |   | 52                        |    | 9                       |   |             |

\*linkage analysis results were showed only normal characters



**Fig. 2.** Comparison of the egg size between normal and *cre* mutant.

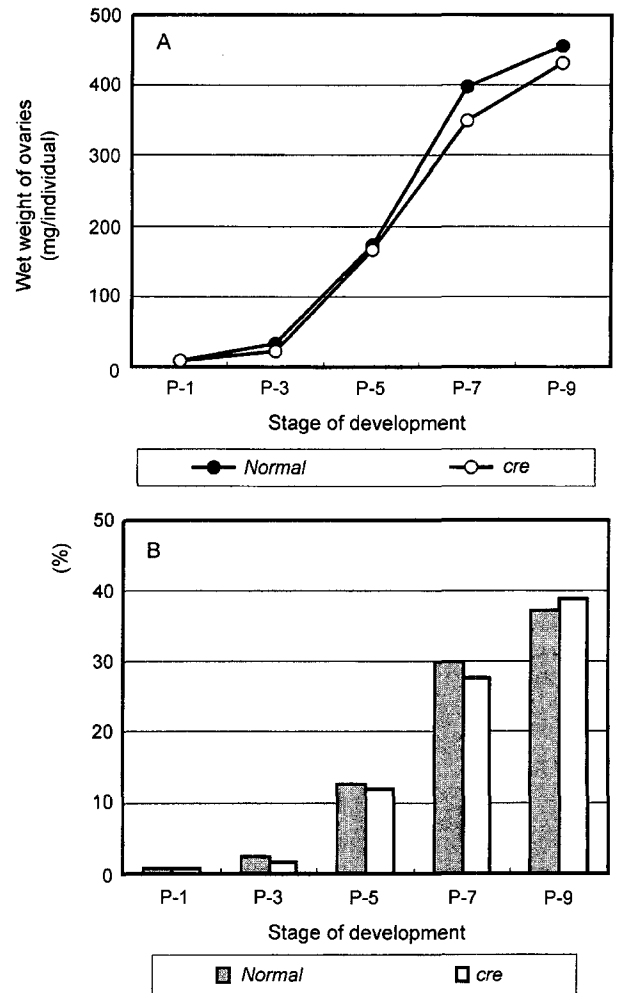
단경의 경우, 정상란이 1.02±0.03 mm, *cre*란이 0.98±0.03 mm였다. *cre*란은 정상란에 비해 장경이 약 0.1 mm 길고, 단경이 약 0.1 mm 짧았다. 따라서 반월형란은 정상란과 비교해 전체 난의 면적은 차이가 없으나 난의 모양이 가늘고 긴 형태인 것을 알 수 있다.

**나. 부화율과 조란수**

산란 후 정상적으로 착색한 난수에 대한 부화란수를 조사하여 실용부화율을 구하였다. 정상란은 86±7%이었으며, *cre*란은 87±6%이었다. 조란수는 정상란이 657±70개이고, *cre*란이 626±56개이었다. 부화율과 조란수의 경우 두 계통간의 차이는 없었다.

**다. 난소중의 변화**

용화 후 번데기의 체중 변화를 보면, 정상란의 경우 용화 1일 1.35 g(♀), 0.97 g(♂) 3일 1.42 g(♀), 1.00 g(♂) 5일



**Fig. 3.** Changes in weight of body and ovary during pupal development. A, wet weight of ovary; B, ratio of ovary weight per pupal body weight.

1.34 g(♀), 0.98 g(♂), 7일 1.34 g(♀), 0.93 g(♂) 및 9일 1.23 g(♀), 0.87 g(♂)이었으며, *cre*란은 용화 1일 1.40 g(♀),

1.09 g(♂), 3일 1.41 g(♀), 1.04 g(♂), 5일 1.38 g(♀), 0.96 g(♂), 7일 1.27 g(♀), 0.90 g(♂) 및 9일 1.11 g(♀), 0.87 g(♂) 이었다. 발육경과에 따른 번데기의 체중변화는 정상란과 *cre*란 모두 발육에 따라 감소하는 경향이였으며, 무게에 있어서도 양자간에 거의 동일하였다.

난소중의 변화를 살펴보면(그림 3A), 정상란의 경우 용

화 1일은  $8.6 \pm 2.3$  mg이었지만 3일  $32.3 \pm 8.2$  mg, 5일  $171.7 \pm 18.5$  mg 및 7일  $398.3 \pm 43$  mg로 급격히 증가해 9일은  $456.3 \pm 62.1$  mg에 달했다. 한편 *cre*란의 난소중을 보면, 용화 1일은  $9.6 \pm 2.6$  mg, 3일  $22.9 \pm 7.3$  mg, 5일  $165.9 \pm 27.4$  mg, 7일  $350 \pm 36.9$  mg 및 9일은  $432.5 \pm 45.3$  mg으로 되었다. 난소의 발달은 정상란과 *cre*란이 거의 동일한 양상이었으며, 용화 초기와 비교해서 약 50배 이상 증가하였다. 또한 번데기무게에 대한 난소의 무게비율을 보면 발육초기에 약 0.6%에서 발육말기에는 약 40% 정도에 달하였다(그림 3B).

라. 용기 체액단백질의 분석

정상란의 용기 체액단백질의 양적변화를 나타낸 것이 그림 4A이다. 용화 1일에 암컷 390  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 수컷 370  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 9일째에는 암컷 180  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 수컷 170  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이었다. 용기 체액단백질의 농도는 암컷이 수컷에 비하여 높았다.

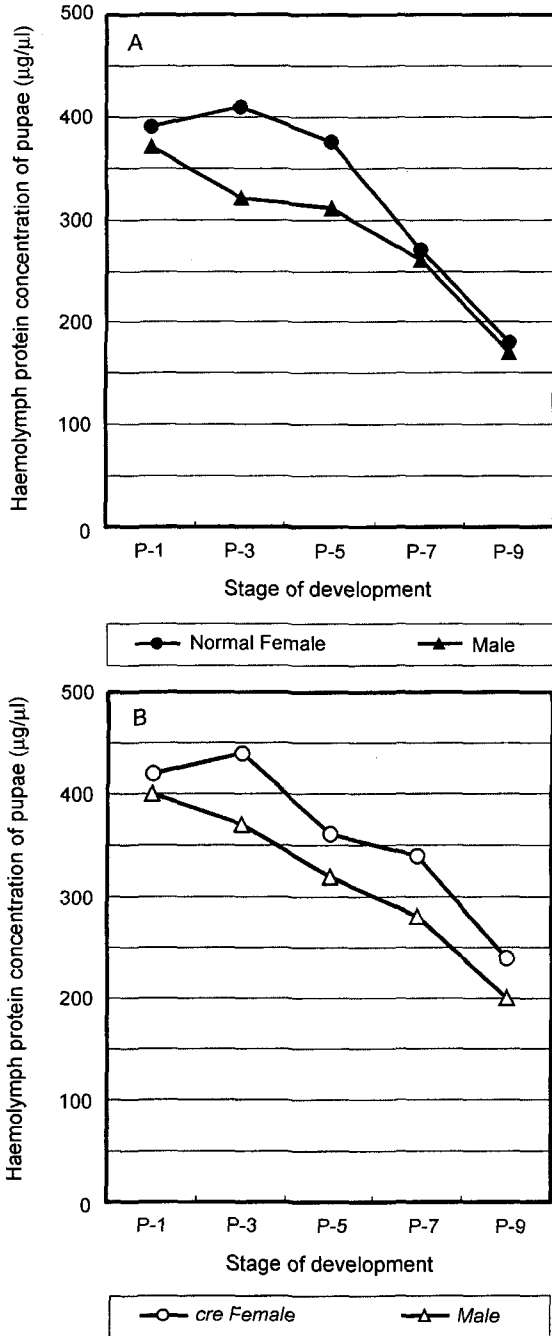


Fig. 4. Changes in haemolymph protein concentration during pupal development of normal and *cre* mutant.

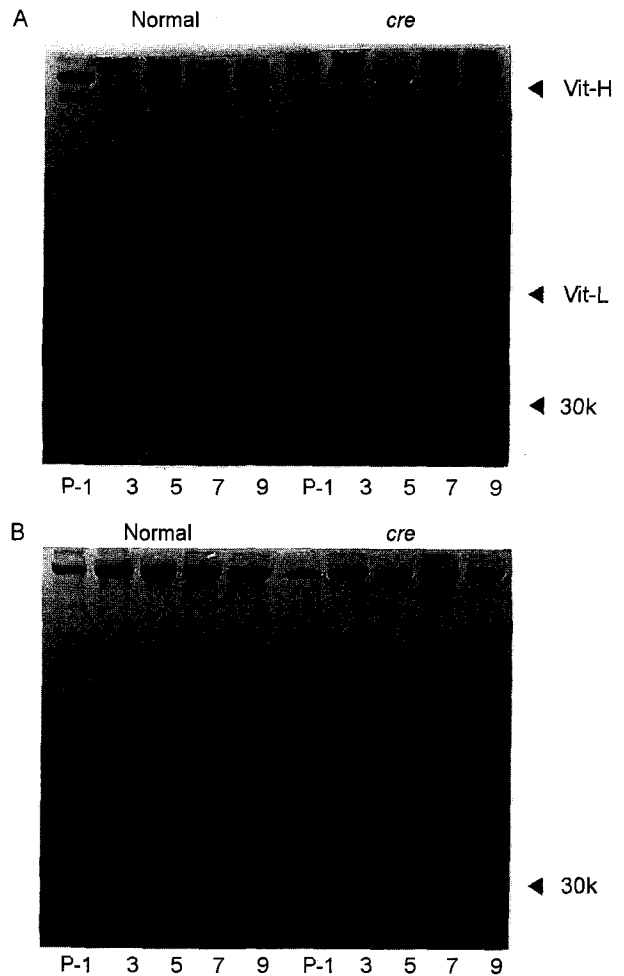


Fig. 5. SDS-PAGE profiles of haemolymph proteins during pupal development. A, Female; B, Male; Vit-H, Vitellogenin-H; Vit-L, Vitellogenin-L; 30 k, 30 k protein.

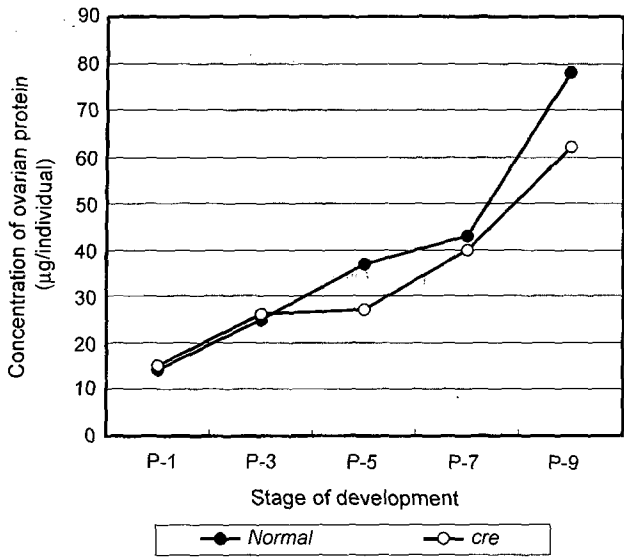


Fig. 6. Changes in concentration of ovarian protein during pupal development.

cre란의 체액단백질 농도(그림 4B)는 발육에 따라 감소하는 경향이였으며 정상란과 변화양상이 동일하였다.

SDS PAGE에 의해 용기 체액단백질의 구성성분을 조사하였다(그림 5). 정상란과 cre란의 암컷의 경우(그림 5A), vitellogenin-H, vitellogenin-L 및 30 k protein 등의 주요성분과 수종의 미량성분이 검출되었다. vitellogenin-H와 vitellogenin-L은 암수에서 성 특이성이 나타났으며 기타 성분의 경우에는 암수간에 차이가 없었다. 정상란과 cre란 사이에서 번데기 체액단백질성분의 질적인 차이는 인정할 수 없었으며 양자 모두 발육과 함께 각 성분들이 감소하는 것으로 나타났다.

마. 난황단백질의 변화

번데기의 발육경과에 따른 난소(난)단백질의 함량변화를 보면(그림 6), 정상란에서는 용화 1일째에 14 µg에서 발육에 따라 급격히 증가해 용화 9일째에는 78 µg이었다.

cre란에서는 용화 1일째에 15 µg이었고 용화 9일째에서는 62 µg이었다.

그림 7에 난소 및 난황 단백질성분의 SDS 전기영동상을 나타내었다. 정상란과 cre란 모두 용화 1일째에 Vitellin-H, Vitellin-L, ESP, 30 k protein 등의 성분이 소량 검출되었으나 발육이 진행됨에 따라 각각의 성분들은 주요성분으로 나타났다.

3. 조직형태학적 관찰

가. 난각표면구조

정상란의 난각표면구조를 그림 8에 나타냈다. 정공부(그림 8A)에 있어서는 가장 특유의 국화상 반문이 관찰되

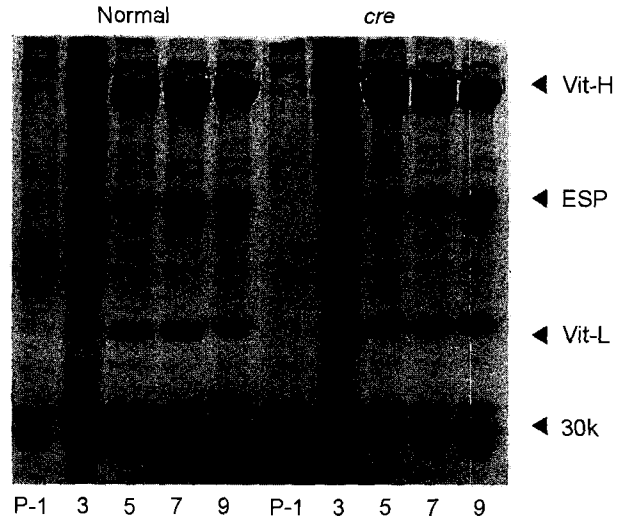


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of yolk proteins in ovarial development. Vit-H, Vitellin-H; ESP, Egg specific protein; 30 k, 30 k proteins.

었다. 측면중앙부(그림 8B)에서는 그물상구조가 관찰되었는데 이 구조에 의해 둘러싸인 구획내에는 크기와 형태가 불규칙한 소피가 6-8개가 관찰되었다. 그림 8C의 후극부에서는 소피로 이루어진 과립상구조가 관찰되었으며, 복면부(그림 8D)와 배면부(그림 8E)의 표면구조에서는 불규칙한 과립상 구조를 나타냈다.

cre란의 경우(그림 9), 정공부(그림 9A)의 구조는 정상란의 그것과 동일한 국화상 반문을 나타냈다. 측면부(그림 9B)에 있어서도 정상란과 동일한 그물상 구조가 관찰되었으며, 구획내의 소피가 5~8개인 것이 대부분이었다.

후극부와 복면부(그림 9C와 D)에서는 정상란의 구조와 유사한 과립상구조가 관찰되었다. 한편, 배면부(그림 9E)의 경우, 정상란의 경우와 전혀 다른 구조가 관찰되었는데 정상란의 배면부에서는 인정할 수 없었던 그물상구조가 관찰되었다. 이 구조는 난의 측면부에서 관찰되는 구조와 동일한 것으로 구획내에는 불규칙한 소피가 5~8개 정도 관찰되었다. 또한 cre란의 배면부에는 난의 장축방향으로 형성된 2~3개의 주름이 관찰되었다.

나. 포란세포의 조직학적관찰

반월형란의 난형 형성과 포란세포와의 관계를 밝히기 위하여 난형성과정의 포란세포를 조직학적으로 관찰하였다.

용화 5일째 암번데기의 난소소관으로부터 chorion 단백질 분비전의 난소란을 관찰하였다(그림 10). 종단면으로 본 정상란(그림 10A)과 cre란(그림 10C)의 형태는 모두 타원형에 가까운 형태이었다. 정상란과 cre란의 포란세포는 세포의 길이가 폭에 비해 더 긴 각주형을 나타내었으며, 배면부와 복면부에서의 세포의 형태에는 차이가 없었

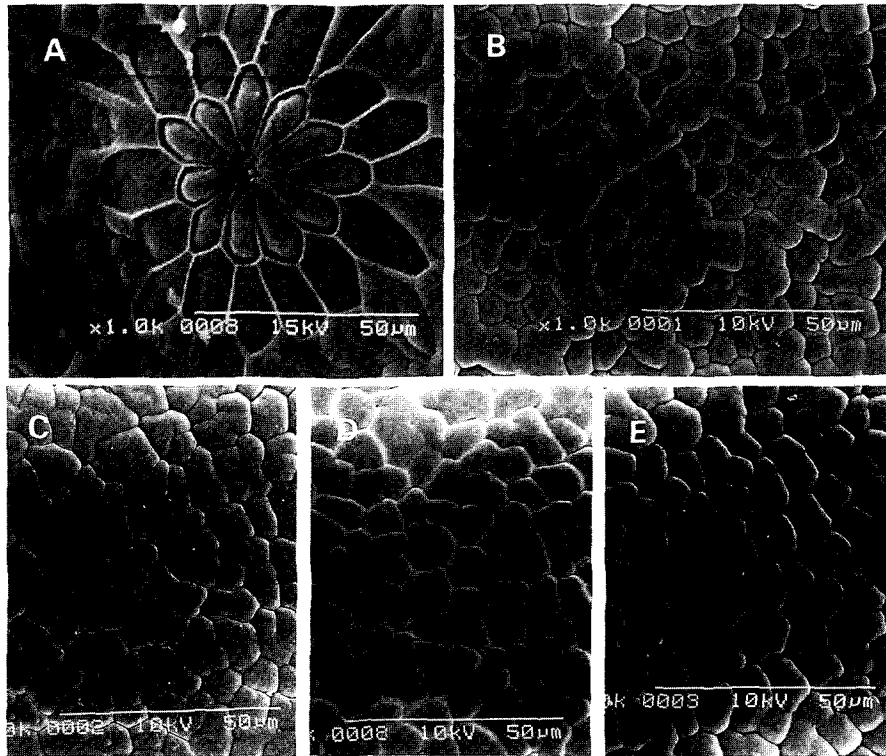


Fig. 8. Scanning electron micrographs of the outer surface of the normal eggshell. A, micropyle region; B, lateral (flat) region; C, posterior region; D, ventral region; E, dorsal region.

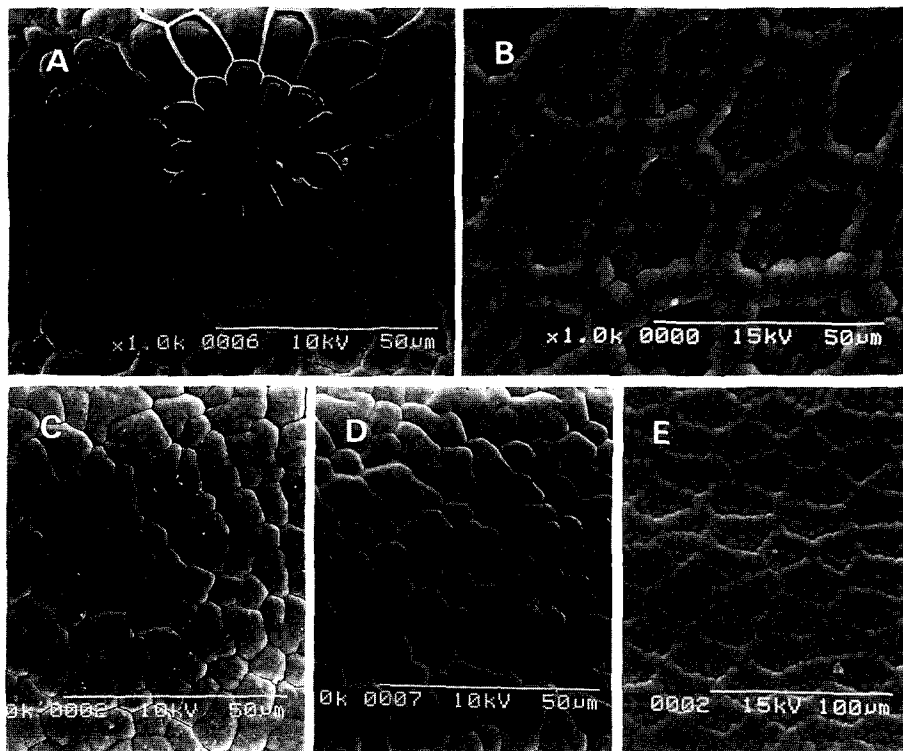
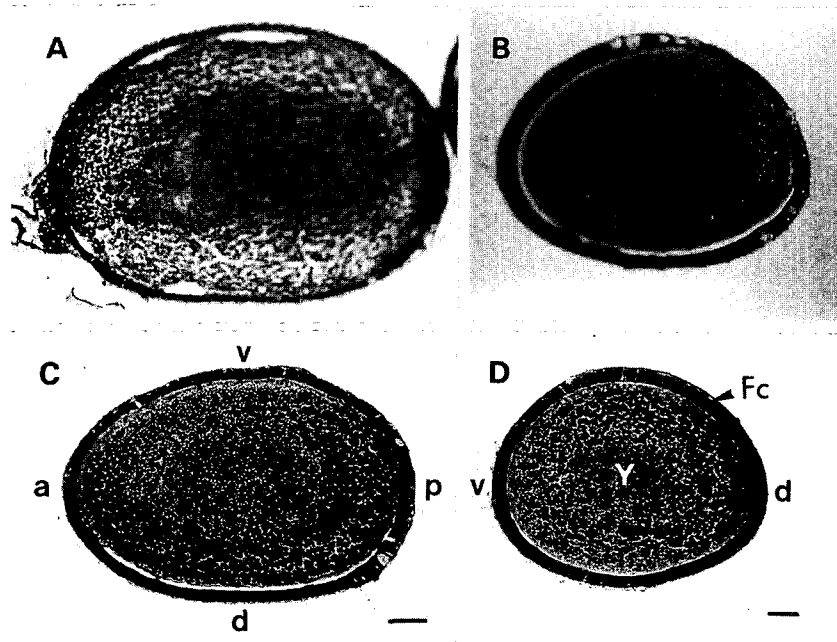
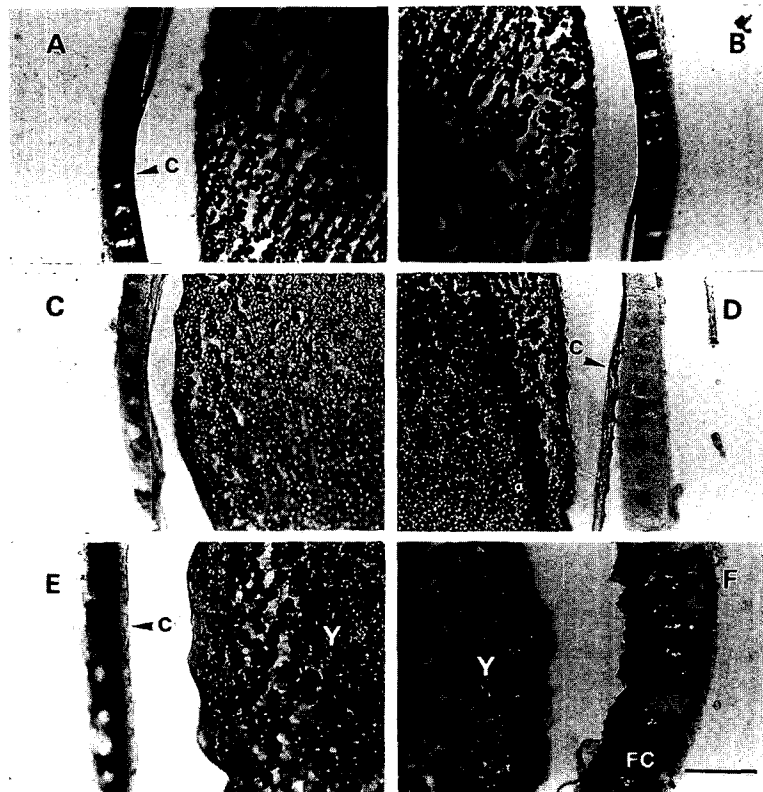


Fig. 9. Scanning electron micrographs of the outer surface of the *cre* eggshell. A, micropyle region; B, lateral (flat) region; C, posterior region; D, ventral region; E, dorsal region.



**Fig. 10.** Light-microscopic pictures of normal and *cre* mutant ovaries during pre-choriogenic stage (chorionic material is not yet secreted from the follicle cells). Fc, follicle cell; Y, yolk granule; A and C, longitudinal sections of normal(A) and *cre* mutant(B); B and D, cross section of normal(B) and *cre* mutant(D); a, anterior pole; p, posterior pole; v, ventral side; d, dorsal side. Scale bar = 10  $\mu$ m.



**Fig. 11.** Light-microscopic pictures of normal and *cre* mutant follicle cells during the development stages of chorion formation (formation of chorion is completed). A and B, longitudinal sections of normal follicle cells on the ventral side(A) and dorsal side(B); C and D, longitudinal section of *cre* mutant follicle cells on the ventral(C) and dorsal side(D); E and F, cross section of *cre* mutant follicle cells on the ventral(E) and dorsal side(F); Fc, follicle cell; Y, yolk; C, chorion. Scale bar = 10  $\mu$ m.



다. 또한 정상란과 cre란 사이에서도 포란세포의 형태적인 차이는 인정할 수 없었다.

Chorion 단백질 분비말기의 배면부 및 복면부 포란세포의 관찰상을 그림 11에 나타냈다. 이 시기가 되면 정상란과 cre란은 각각 전형적인 난형을 나타내게 된다. 그림 11의 A와 B는 정상란의 종단면 조직관찰상중 복면부(A)와 배면부(B)를 나타낸 것으로, 양 부위의 포란세포는 그 형태나 크기에 있어서 동일하였다. 반면, 같은 시기의 cre란의 경우, 복면부(그림 11C)와 배면부(그림 11D)의 포란세포에는 현저한 형태적인 차이를 나타냈다. 즉 배면부의 세포가 복면부를 형성하는 세포에 비해 세포의 길이 방향으로 뚜렷하게 신장되어 있으며, 이와 같은 현상은 cre란의 횡단면(그림 11E, F) 조직관찰상에서도 동일하게 나타났다.

**다. 등전점 전기영동에 의한 난각단백질의 분석**

난각을 구성하는 chorion 단백질에 대한 조성단백질의 질적인 차이를 분석하기 위하여 정상란과 cre란의 난각단백질에 대한 등전점 전기영동을 실시하였다(그림 12). 전

기영동 분석결과, 정상란과 cre란의 난각단백질은 등전점 4.1~8.5에 대부분의 성분이 위치하며 13종의 주요성분과 8종의 미량성분으로 분리되었다. 정상란과 cre란의 난각단백질은 조성성분의 양적차이는 물론 질적인 차이도 인정할 수 없었다.

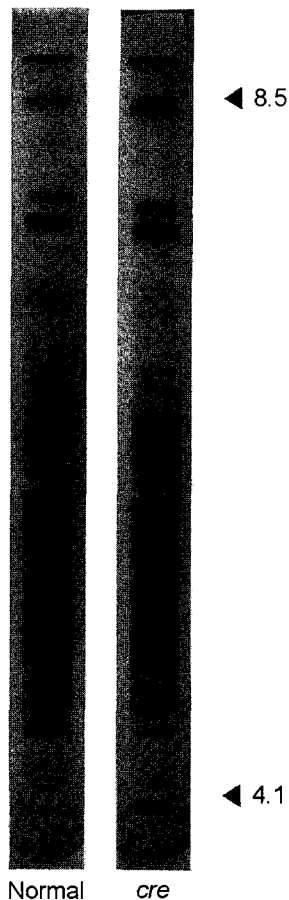
**고 찰**

1989년 본 대학 곤충유전자원학 연구실에서 발견된 cre란은 난형이 반달모양을 한 난형이상 돌연변이체이다. 이 새로운 돌연변이체에 대한 유전학적분석을 실시한 결과, 상염색체에 좌위하는 1개의 열성유전자에 의해 지배되는 난형관련 변이형질임이 확인되었다. 현재까지의 연관분석결과 제 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 27등 20개 연관군과는 독립인 것이 밝혀졌다. 본 연구에서는 이상과 같은 유전학적 분석과 함께 형질발현기구를 밝히기 위한 연구의 일환으로 cre유전자의 형질 특성에 대하여 분석하였다.

난의 장경과 단경을 조사한 결과 cre란은 정상란에 비해 장경이 약 106%, 단경이 약 96%인 것으로 나타났다. 따라서 cre란은 정상과 비교할 때 난의 전체 면적에 있어서는 차이가 없으나 난의 형태가 가늘고 긴 것을 알 수 있다. 또한 cre란은 정상적인 수정능력과 부화능력이 있음이 확인되었다.

누에에 있어서 난소의 발육은 증식기, 성장기, 성숙기의 3기로 나누어진다(大規, 1978). 이 중에서 실질적인 난소의 발달은 난황과 난각이 형성되는 성장기이고, 번데기기간이 이 시기에 해당한다. 따라서 난형은 난형성이 이루어지는 번데기기간 동안 결정되므로, 이 기간 동안 난형성과 관련된 형질에 대하여 조사하였다. 번데기 무게는 정상란계통과 cre란 계통 모두에서 발육경과에 따라 감소하였으며, 난소의 무게는 경과에 따라 두 계통 모두 급격히 증가하였다. 번데기 무게에 대한 난소의 무게비를 보면, 용화 1일에 0.6%에서 9일째에 37~38%로 급격히 증가하였으며, 정상란과 cre란에서 차이는 없었다. 정상란계통과 cre란 계통의 번데기 체액단백질 및 난소(난)단백질에 대한 정량·정성분석에서 cre란 계통에서만 나타나는 특이적인 양적변화나 단백질성분의 질적인 차이에서 오는 특이성분은 인정할 수 없었다. 즉, cre란의 특이난형은 난형성과정 중 특정단백질성분의 존재나 양적인 차이로부터 기인하는 것은 아니라는 사실이 밝혀졌다.

난의 형태는 난각에 의해 결정되며 난각은 포란세포로부터 분비되는 chorion 단백질에 의해 형성된다(Sander, 1985). 난각에는 각각의 부위에 따라 특이적인 표면구조가 나타나는데 정공부, 측면부, 배면 및 복면부 등이 그



**Fig. 12.** Isoelectric focusing patterns of the chorion proteins between normal and cre mutant chorion.

것이다(宮板, 1935, 松崎, 1968). 난형이상 변이체인 *cre*란의 난각구조를 조사한 결과 난각의 표면구조에서 정상란의 그것과는 상이한 구조가 관찰되었다. 정상란의 경우, 난의 배면부와 복면부에서 크기가 불규칙한 소괴상구조가 동일하게 나타난 반면 *cre*란의 경우에는 배면부와 복면부의 표면구조가 상이하였다. 즉, 복면부는 정상란과 동일한 소괴상구조를 나타냈으며 배면부에서는 그물상구조가 관찰되었다. 등접전 전기영동에 의한 *cre*란의 chorion 단백질은 정상란과 동일한 조성을 나타냈으며, *cre*란의 이상난형과 관련된 특이적인 chorion 단백질성분은 없는 것으로 확인되었다. 난각의 표면에 나타나는 부위 특이적인 난각구조는 포란세포의 부위특이적 난각형성능에 의해서 형성된다(Kafatos *et al*, 1977). *cre*란의 배면부 난각표면구조에서 측면부에서 관찰되는 그물상구조와 동일한 구조가 관찰되었는데, 이 사실은 *cre*란의 배면부를 형성하는 포란세포가 복면부를 형성하는 세포와는 다른 부위특이성을 나타내는 것이며, 나아가서 측면부의 포란세포와 동일한 난각형성능을 가지는 것으로 생각된다. *cre*유전자가 어떠한 작용기구에 의해 난각단백질의 구축과정에 관계하며 복면부의 부위특이적인 난각구조를 나타내는지에 대해서는 아직 불명확한 상태지만 *cre*유전자는 난의 크기, 부화, 조란 및 난소무게 등의 형태적 특성발현이나 단백질성분과는 무관한 것으로 생각된다.

## 적 요

새로운 난형이상 자연발생 돌연변이체인 반월형란(*cre*)에 대한 유전자 연관분석과 유전형질의 특성에 대하여 조사하였다. 현재까지의 유전자 연관분석에서 *cre*유전자는 집누에 28개 연관군중 20개의 연관군과 독립하는 것이 밝혀졌다. *cre*란은 수정 · 부화 및 조란이 모두 정상적이며 번데기체액 단백질의 함량과 성분도 정상란과 차이가 없었다. 난소의 발육에 따른 난황단백질의 함량 및 성분에서도 정상과 차이가 없었다. *cre*란의 배면부 난각 표면구조에서 정상란과는 상이한 구조가 관찰되었으며 이 구조는 측면부의 표면구조와 유사하였다. 이상의 결과에 의해 반월형란의 난형 이상은 배면부의 난각 부위특이성과 함께 난각구축과정에서의 이상에 기인하는 것으로 추측된다.

## 인용문헌

Doira, H. (1983) Linkage maps of *Bombyx mori*-Status quo in 1983, *Sericologia*, **23** : 245-269.

- Doira, H., H. Fujii, Y. Kawaguchi, H. Kihara and Y. Banno (1992) Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori* ; Important genetic resources(Doira. H. ed) p 73, In stitute of Genetic Resources, Faculty of agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan.
- 홍선미 · 선희숙 · 이재만 · 노시갑(1998) 새로운 卵形異常 돌연변이 半月形卵(*cre*)의 유전형질, 한잠학지 추계학술발표자료., 36.
- Kafatos, F. C., J. C. Regier, G. D. Mazur, M. R. Nadel, H. M. Blan, W. H. Pteri, A. R. Wyman, R. E. Gelinias, P. B. Moore, Paul and M. R. Goldsmith (1977) The eggshell of insects : Differentiation-specific proteins and the control of their synthesis and accumulation during development. In Result and Problems in Cell Differentiation (Beermann. W., ed), **8** : 45-145.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the gead of bacteriophage T4, *Nature*, **227** : 680-685.
- 河口 豊 · 藤 博(1984) カイコの退化型卵形における卵タンパク質, *日蚕雜*, **53**(5) : 448-455.
- 河口 豊 · 土 良宏 · 藤 博(1987) トリパンブルーによるカイコの卵形成阻害, *日蚕雜*, **56**(4) : 305-312.
- 松崎 守未(1968) 家蚕卵の 卵殻形成に関する電子顯微鏡的研究, *日蚕雜*, **37** : 483-490.
- 宮坂 收(1935) 家蚕卵殻の構造に就いて, *蚕絲學雜誌*(上田), **8** : 117-126.
- Nadel, M. R. and F. C. Kafatos (1980(a)) Specific protein synthesis in cellular differentiation. IV. The chorion protein of *Bombyx mori*. and their program of synthesis, *Develop. Biol.*, **75** : 26-40.
- Nadel, M. R. M. R. Goldsmith, J. Goplerud and F. C. Kafatos (1980(b)) Specific protein synthesis in cellular differentiation. V. A Secretory defect of chorion formation in the *Grcol* mutant of *Bombyx mori*, *Dev. Biol.*, **75** : 41-58.
- 大槻郎樹 · 神田俊男(1978) カイコの潰れ卵系統の卵殻の特異構造. *日蚕雜*., **47** : 215-220.
- Regier, J. C. G. D. Mazur, F. C. Kafatos and M. Paul (1982) Marphogenesis of silkworm chorion : Initial framework formation and its relation to synthesis of specific proteins, *Dev. Biol.*, **92** : 159-174.
- Sander, K. H., O. Gutzeit and H. Jackle (1985) Insect embryogenesis, morphology, physiology, genetical and molecular aspect., in *Comprehensive Insect Physiol. Biochem. and Pharmacology* (ED. Kerkut, G. A. and L. I. Gilbert), Pergamon Press, **1** : 321-385.
- Kawaguchi, Y., Y. Banno, K. Koga and H. Doira (1996) Changes of yolk and haemolymph proteins during ovrian development on the miniature egg mutant, emi, of *Bombyx mori*, *J. Seri. Sci. Jpn.*, **65**(1) : 13-20.