

경북 북부지역의 양잠산업에 피해를 주고 있는 누에(*Bombyx mori*) 미화용 기작에 관한 연구

김용균* · 배상기 · 이선영 · 지동진 · 김진¹ · 홍용표² · 김길호³

안동대학교 자연과학대학 농생물학과, ¹(주) 경농 중앙연구소

²안동대학교 자연과학대학 응용화학과, ³상주대학교 농학부 잠사곤충자원학과

A Possible Mechanism Related with Non-spinning Syndrome of *Bombyx mori* that Intimidates the Sericultural Industry in Northern Kyungbuk

Yonggyun Kim*, Sangki Bae, Sunyoung Lee, Dongjin Ji, Jin Kim¹, Yongpyo Hong² and Kilho Kim³

Department of Agricultural Biology, Andong National University, Republic of Korea

¹Central Research Institute, Kyung-Nong Corporation, Republic of Korea

²Department of Applied Chemistry, Andong National University, Republic of Korea

³Department of Sericulture & Entomology, Sangju National University, Republic of Korea

ABSTRACT : Non-spinning syndrome of *Bombyx mori* has been serious issue in sericulture industry near Kyungbuk area. This study was focused on the analysis of the mechanism and on screening candidate chemicals inducing the anti-metamorphosis of the silkworms. Rearing temperatures or initial body weight of the final instar larvae did not affect a normal larval to pupal metamorphosis of *B. mori*. However, pyriproxyfen (a juvenile hormone (JH) agonist) induced follicle patency significantly even at its 10^{-8} M concentration and inhibited metamorphosis of *B. mori* in both developmental time and dose-dependent manners. Pyriproxyfen induced JH esterase (JHE) activity and downregulated expression of JH binding protein of *B. mori*. These results suggests that pyriproxyfen induced JHE activity as a JH agonist and that the elevated JHE activity degraded endogenous JH and resulted in JHBP gene expression. Based on the fact that the JH agonist induced follicle patency and inhibited metamorphosis of *B. mori*, follicle patency bioassay suggested that three commercial pesticides including simazine, molinate or alachlor were proved to give potent JH agonistic effect on *B. mori*. Further direct exposure experiments to these candidates are required to determine the chemicals responsible for the non-spinning syndrome of *B. mori*.

KEY WORDS : *Bombyx mori*, Juvenile hormone, JH binding protein, JH esterase, Non-spinning syndrome, Pyriproxyfen

초 록 : 경북 북부지역의 양잠농가에 피해를 주고 있는 누에(*Bombyx mori*)의 미화용 유발 문제에 대한 원인과 기작을 밝혀내는 데, 이 연구의 궁극적 목적을 두었다. 일반 사육환경에서 나타날 수 있는 발육온도(20, 25, 30°C)와 최종령 초기 유충 체중 변이(412.6-1, 616.0 mg)는 누에의 용화 결정에 영향을 주지 않았다. 한편 유약호르몬(juvenile hormone: JH) 동력제인 피리프록시펜(pyriproxyfen)은 10^{-8} M의 낮은 농도에서도 난포세포 개방화를 유도하여, 이 약제가 누에에서도 JH 동력제라는 것을 확인하였다. 피리프록시펜은 약제 농도 및 처리 시기별로 특이하게 누에 미화용 유발 효과를 보였다. 피리프록시펜은 JH 에스테라제(JH esterase: JHE)를 직접적으로 억제하지 못하고, 오히려 활성을

*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

증가시키는 것으로 나타났으며, JH 결합단백질(JH binding protein: JHBP)의 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 즉, 피리프로록시펜은 체내에 JH 동력제로 작용하면서 JHE 유전자 활성을 제고시켰지만, JHE 활성 증가에 따른 체내 JH 함량이 줄어들어 따라 JHBP의 유전자 활성을 억제하는 것으로 해석된다. 양잠농가 주변으로 살포 가능성이 있는 농약을 대상으로 난포세포 개방화 분석을 실시한 결과, 제초제 3종(simazine, molinate, alachlor)이 JH 동력제 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다. 누에 미화용 원인체 규명을 위해서 이들에 대한 직접 노출 시험이 요구된다.

검색어 : 누에, 미화용, 유약호르몬, 유약호르몬 결합단백질, 유약호르몬 에스테라제, 피리프로록시펜

최근 상주와 안동을 중심으로 한 경북 북부 지역의 양잠농가에서 미화용(유충의 변태 불능)의 발생빈도가 높아져 동충하초 농가에 심각한 피해가 속출하고 있다. 이러한 피해는 양잠농가에 적지 않은 경제적 손실을 가져오므로 피해 원인과 방제 대책이 시급히 이뤄져야 할 지경에 이르렀다.

곤충의 변태는 두 가지 주요 호르몬의 시기적 체내 농도조절에 의해 야기된다(Riddiford, 1994). 유약호르몬(juvenile hormone: JH)이 변태를 억제하는 반면, 엑디스테로이드류(예, 20-hydroxyecdysone)는 탈피와 변태를 유도한다. JH의 존재속에서 엑디스테로이드는 유충 탈피를 유도할 수 있으나, 특정 시기(예, 종령 또는 번데기)에 JH 존재는 변태유발을 불가능하게 한다(Riddiford, 1978). 누에(*Bombyx mori*)의 경우에도 변태 호르몬의 신호는 종령 유충기의 JH 부재에서 비롯된다고 볼 수 있다(Sakurai, 1983; Plantevin *et al.*, 1987). JH 부재는 전흉샘 활성화와 실샘 성장을 촉진시키고, 주요 혈림프단백질의 합성을 유도하여 변태 과정에 이르게 한다(Garel, 1983; Okuda *et al.*, 1985; Plantevin *et al.*, 1987).

누에 변태 불능에 대한 원인으로서는 다양한 인자가 제기되어왔다. 이러한 원인들 중에서 인근의 농약 살포 지역에서 비산된 약제의 잔류가 가장 설득력이 있는 원인으로 지목받고 있다. 이러한 이유는 바로 이 경상북도 북부지역이 사과 재배지와 시설 재배지의 밀집지역으로 비교적 많은 양의 농약 살포가 이뤄지고 있기 때문이다(Kim and Choo, 1994). 사과 재배지의 경우 이 지역에서는 연 10회 이상의 농약 살포가 이뤄지고 있고, 시설재배지도 작목에 따라 다양하지만 연 10회 이상의 농약이 투입되고 있다(Lee *et al.*, 1996; Kim, 1997). 이러한 화학 농약의 살포에 따른 지역 환경 문제가 거론되면서 주로 신경독에 기인된 급성 화학 살충제 보다는 인축에 보다 안전하다고 믿어지는 생물농약이나 곤충성장조절제(Insect growth

regulator: IGR)와 같은 IGR 농약으로 조금씩 대체되고 있는 실정이다. 앞으로 이러한 IGR 계통의 농약 살포 비중은 보다 높아지리라 전망되고 있다. 이러한 IGR 계통의 농약은 곤충의 발육과정이 인간을 포함한 유용동물과 차이가 나는 특이한 생리 현상을 이용하여 이를 교란함으로써 방제 효과를 얻고자 하는 목적으로, 누에 미화용 유발에 직접적 원인으로 주목받고 있다(Cappelozza *et al.*, 1995; Kamimura, 1995; Kim *et al.*, 2002). 특히 유약호르몬 작용 동력제들(agonists)이 이에 직접적으로 관여하는 것으로서 곤충의 정상적인 발육 및 변태를 억제시키게 된다. 유약호르몬은 sesquiterpenoid 구조를 가지고 있는 지질호르몬으로서 작용기작면에서 스테로이드성 호르몬과 유사하다고 알려지고 있다(Riddiford *et al.*, 2003). 즉, 유충의 경우 표적 세포내 수용체를 이용하여 발육과 변태에 관련된 유전자의 발현을 억제시켜 상태유지('status quo') 효과를 가져오게 한다. 반면에 성충기에는 생식선 자극 호르몬(gonadotropin)으로 작용하여, 특히 암컷의 난황 물질 형성 및 축적 과정을 촉진시키게 된다(Wyatt and Davey, 1996). 후자의 유약호르몬 작용 효과의 경우, 유약호르몬은 세포내 수용체보다는 세포막 수용체를 이용한다고 보고되고 있다(Sevala *et al.*, 1995). 이러한 사실을 이용하여 JH 유사체(JH analog)들의 생리 효과의 검증이 분자 수준에서 실시될 수 있었다(Kim *et al.*, 1999). JH의 체내 농도와 표적 세포에서 유효농도가 nanomolar 영역에 있기 때문에 극미량의 JH 유사체 노출에도 변태불능의 결과를 초래할 수 있다(Riddiford, 1994; Monconduit and Mauchamp, 1998). 또 다른 JH 교란 변태 불능 기작으로서 JH의 대사과정에서 중요한 JH 에스테라제(JH esterase: JHE)가 억제되면 체내 유약호르몬의 농도를 유지시켜주는 결과가 되어, JH 유사체와 유사한 증상을 보여주게 된다. 즉, 기존의 에스테라제 저해성 화합물도 유약호르몬 작용 동력제의 범위에 포함될 수도 있다.

경북북부 지역에서 많이 살포되고 있고, 누에의 변태 불능에 영향을 주리라고 여겨지는 IGR 계통 중에서 탈피억제제인 디플로벤주론(diflubenzuron)을 가지고 피해 분석이 진행되었다(Kim and Sohn, 2001). 디플로벤주론으로 처리된 뵤잉을 섭식시키면 섭식 시기와 기간에 따라 뚜렷하게 변태 불능의 효과를 보였다(Kim, 2002). 디플로벤주론의 변태억제 기작을 분석한 결과, JH 수용체에 결합하는 능력은 없는 것으로 나타났다. 헐림프내 특이적 에스테라제의 활성을 저해하는 것으로 판명이 되었다(Kim et al., 2002). 이는 디플로벤주론이 JH의 대사 작용을 억제시킴으로 변태를 결정하는 임계시기에도 체내 JH가 유지됨으로 변태 불능에 이르게 한 것으로 추정되고 있다. 그러나 피해 누에의 생리적 교란 형태가 실제 농가에서 나타나는 현상과 차이가 있어, 디플로벤주론이 직접적 원인이라고 판단하는 데는 아직 설득력이 부족하다.

국내 사육 누에를 대상으로 유약호르몬 유사체인 페녹시카브(fenoxycarb)가 매우 저농도에서도 변태 불능의 효과를 가져온다고 조사되었다(미발표자료). 그러나, 이 농약은 경북북부지역에서 살포되고 있지 않은 실정이어서 효과는 매우 뚜렷하지만, 본 지역의 피해 원인으로서는 고려되지 못하고 있다.

본 연구는 경북 북부지역에서 피해가 속출하고 있는 누에의 변태불능을 외부에서 기인된 인자에 의해 곤충 체내의 내분비계에 교란을 주는 전형적 내분비계교란물질의 작용으로 기본적 가설을 세웠다. 이에 대한 원인 물질을 규명하기 위해 피해 누에의 생리 교란 기작을 분석하고, 이를 바탕으로 원인물질의 스크리닝이 이뤄져야 한다. 미화용 기작 규명을 위해 우선 원인체를 화학적 및 비화학적 요인으로 구분하였다. 화학적 요인은 유약호르몬 유사체가 나타내는 변태억제의 기작을 바탕으로 이 지역에서 살포되고 있는 농약들 가운데 내분비계교란의심물질로 간주되는 약제들을 중심으로 유약호르몬과 유사한 기능을 소유하는지를 스크리닝하였다.

재료 및 방법

연구 전략

누에 미화용을 유발하는 요인과 기작을 분석하기 위해, 우선 비화학적 요인의 누에 미화용 유발 가능성 분석, 다음으로 유약호르몬 유사체에 의한 누에 미화

용 유발 확인 및 기작 분석 그리고 끝으로 경북 북부 양잠농가에 노출 가능성이 있는 농약들의 유약호르몬 유사 기능 분석으로 단계별 추진 전략을 세웠다.

누에 사육

경상북도 농업기술원 잠사곤충사육장에서 인공사료로 사육된 장려품종 칠보잠(잠107×잠108, *B. mori*)의 2면잠을 분양받아 사용하였다. 시험에 사용한 누에는 1령부터 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 70-80%, 광주기 16:8h (L:D) 조건에서 인공사료로 사육하였다.

시험 약제

피리프록시펜(Pyriproxyfen: 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propylether)은 98%의 원제로 (주) 동방아그로에서 얻었다. JH 유사 기능 스크리닝을 위해 분석될 농약은 양잠농가에 직접 또는 간접적으로 노출될 수 있는 농약과 일반적 내분비계교란의심체에 바탕을 두어 5 가지 농약(simazine, molinate, alachlor, endosulfan, tebufenozide)을 분석 대상 농약으로 선정하였다. 각각의 상품명인 씨마네(수화제, 바이엘), 선봉장(입제, 동부한농), 라쏘(입제, 동부한농), 지오릭스(분제, 동부한농), 한타(액상수화제, 성보화학)를 시중에서 구입하여 분석하였다.

비화학적 요인의 미화용 누에 유발 분석

온도와 체중이 누에의 용화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 2령부터 20, 25, 30°C 에서 각각 30마리씩 사육하였다. 체중은 동일한 온도 25°C 에서 사육된 누에의 5령 탈피이후 체중을 중심으로 고치형성까지의 기간을 분석하면서 유충기간을 비교하였다.

난포세포 개방화(Follicle epithelium patency) 생물검정

JH 동력제 스크리닝을 위한 생물검정법으로 난포세포의 개방화(follicle patency) 판별법(Abu-Hakima and Davey, 1977; Kim et al., 2004)을 이용하였다. 간략하게, 누에 7일째 암컷 번데기의 난소를 적출하고(난각형성 직전시기), 50 mM 인산완충식염수(pH 7.0)로 3번 세척했다. 이후 5°C 의 Insect Grace's medium (Sigma, MO, USA)에 보관하였다. 분석될 용액이 들어 있는 96 well 각 chamber에 난소소관 일부를 10분간 침지

시켰다. 이후 비교적 염색 입자가 큰 1% Evan's blue 에 5-10초간 염색시킨 후 슬라이드글라스위에 올려놓고 50배의 배율의 해부현미경에서 관찰하였다. 난포세포 개방화평가는 Kim *et al.* (2004)의 방법을 따랐다.

유약호르몬 에스테라제(JHE) 활성 분석

분광광도계로 측정할 수 있는 대체 기질인 HEPTAT (methyl 1-heptylthioacetothioate)를 McCutchen *et al.* (1993)의 방법에 따라 합성하였다. JHE 활성 측정을 위해 반응 용액으로 10% sucrose와 0.025%의 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)를 포함하는 5 mM 인산 완충용액(pH 7.4)을 이용하였다. 기질 HEPTAT는 최종농도가 0.2 mM로 혈림프 시료와 혼합후 3분 간격으로 405 nm에서 흡광도 차이를 분석함으로써 활성을 분석하였다.

에스테라제 활성 분석

에스테라제 활성은 Townson (1972) 방법으로 측정하였다. 혈림프 시료가 2 μ l의 50 mM p-nitrophenyl acetate (80% methanol)와 혼합되고 PBS가 1 ml 채워졌다. 흡광도의 변화는 400 nm에서 측정되고, 표준용액으로 p-nitrophenol이 이용되었다.

JH 결합단백질(JH binding protein: JHBP)

유전자 클로닝

누에의 JHBP 유전자 클로닝은 기존에 알려진 누에 JHBP 유전자의 ORF (open reading frame)의 시작과 말단 부위를 중심으로(Vermont *et al.*, 2001) primer가 형성되었다: forward primer (5'-ATGGC TTCTT TGA-AA GTATT C-3')와 reverse primer (5'-TTAAT TAA-GA TTTTC GAAGA A-3'). 누에 5령충의 지방체가 분리되어 TriPure (Boehringer Mannheim, Germany) 용액으로 Chomczynski and Sacchi (1987)의 방법으로 전체 RNA가 분리되었다. 분리된 RNA 5 μ g을 RT premix (바이오니아, 대전)를 이용하여 oligo dT primer (5'-CCAGT GAGCA GAGTG ACGAG GACTC GAGCT CAAGC TTTT TTTT TTTT TT-3')로 first strand cDNA를 형성했다. 이 cDNA를 기준으로 JHBP 유전자 ORF 영역이 상기 두 primer를 이용하여 증폭되었다. PCR은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분의 주기로 35회 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물은

pGEM 벡터 (Promega, Madison, USA)에 클로닝되어, (주) 마크로젠(서울)에 의뢰하여 DNA 염기서열이 확인되었다. DNA 염기서열 조합은 DNASTAR 프로그램 (Version 5.01, DNASTAR Inc, Madison, USA)을 이용하였다.

유전자 발현 Northern 분석

클로닝된 JHBP의 ORF 영역은 GeneClean kit (Q-BIO gene, Carlsbad, USA)로 정제후 biotin-N4-dCTP (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA)를 표식자로 random primer extension 방법으로 probe가 제작되었다. 시기별 전체 RNA 20 μ g이 전기영동으로 분리되었고, nitrocellulose membrane으로 옮겨졌다. Salmon sperm DNA (Sigma, MO, USA)로 비특이적 결합을 막은 후, 42°C에서 hybridization이 이뤄졌다. 세척 후 alkaline phosphatase가 붙은 streptavidin을 반응시켰다. 이후 CDP-star 기질시약으로 반응시켜 X-film에 노출시켰다.

결 과

온도와 체중이 누에 미화용 유발에 미치는 영향

발육온도가 누에의 미화용 유발에 미치는 영향을 분석하였다(Table 1). 이러한 이유는 누에의 미화용이 무더운 가을 누에보다는 저온 현상이 있는 봄누에에서 많이 발생하기 때문이다. 조사된 모든 발육온도 (20, 25, 30°C)에서 유충 발육기간에서 차이가 있었을 뿐, 미화용은 나타나지 않았다($x^2 = 2.22$, $df = 2$, $P = 0.3292$).

누에를 포함한 많은 곤충류에서 종령 유충의 초기 체중이 다음 탈피의 변태 유무를 결정하는 데 주요한 결정 요인으로 작용하게 된다(Nijhout, 1975). 본 연구는 이러한 체중변화가 누에의 미화용 유발 또는 유충 기간 연장에 영향을 주었는지를 알아보기 위해 5령으

Table 1. Effect of rearing temperature on pupation of *Bombyx mori*

Temperature (°C)	n	Number of cocoon formed	Larval period (days)
20	30	28	31.6±2.8
25	30	28	26.1±1.9
30	30	25	23.7±2.3

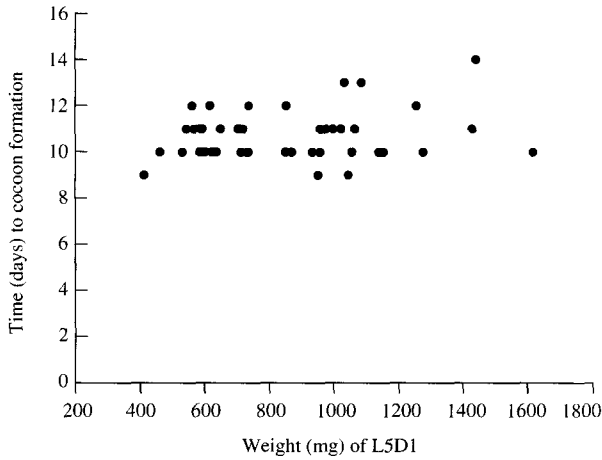


Fig. 1. Effect of body weight of newly molted fifth instar ('L5D1') of *Bombyx mori* on developmental period of the last larval instar.

로 갓 탈피한 누에의 체중과 고치형성까지의 기간을 측정하였다(Fig. 1). 인공사료로 사육한 누에의 5령초기 체중은 412.6 mg에서 1,616.0 mg까지 약 4배의 차이를 보였다. 그러나, 이들 모두 고치를 지었으며, 발육기간 차이도 없었다($F=1.05$; $df=1, 44$; $P=0.3119$).

피리프로キシ펜의 미화용 유발에 미치는 생리교란

JH 유사체로 알려진 피리프로キシ펜이 JH와 유사한 기능을 가지고 있는지를 확인하기 위해 난포세포 개방화 분석이 이뤄졌다. 난포세포 개방화는 피리프로キシ펜의 10^{-8} M과 같은 낮은 농도에서도 일어나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 피리프로キシ펜이 JH와 유사한 활성을 지니고 있다는 기존의 사실을 확인하며, 또한 본 연구에서 JH 동력제 분석에 이용되는 난포세포 개방화 분석법에 있어서 유효성을 입증하는 결과로 해석될 수 있다.

이러한 피리프로キシ펜을 $1 \mu\text{g}$ 의 농도로 누에 5령에 시기별로 국부처리한 경우 25°C 에서 인공사료로 사육한 경우 완전한 미화용을 유발시켰다(Fig. 3A). 이는 5령 탈피 1일전에 처리하였을 때에도 미화용 유발을 하는 것으로 판명되었다. 그러나 5령 11일차에 50%는 정상 고치를 형성하였는데, 이는 실제로 이때 이미 반수 이상이 고치를 형성하고 있었다. 이러한 결과는 피리프로キシ펜이 JH 동력제로서 변태억제 유발에 주요인이 될 수 있다는 것을 의미한다. 또한 $1 \mu\text{g}$ 과 같이 비교적 높은 농도에서는 중령기 처리 시기에 관련

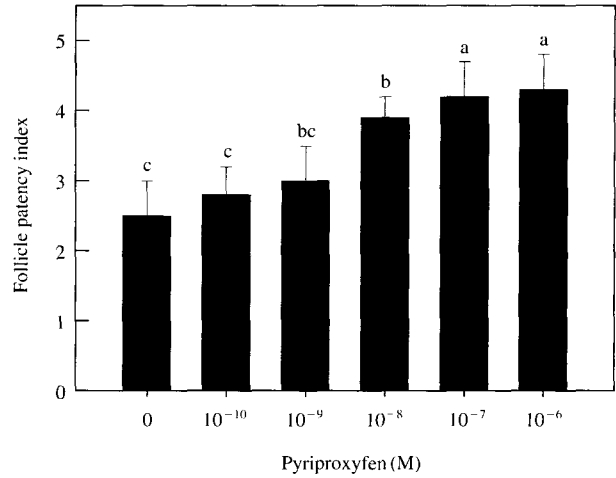


Fig. 2. Effect of pyriproxyfen on follicle epithelium patency of *Bombyx mori*. Each treatment consists of 5 measurements. Different letters above the error bars indicate significant difference of the means at Type I error = 0.05 (LSD test).

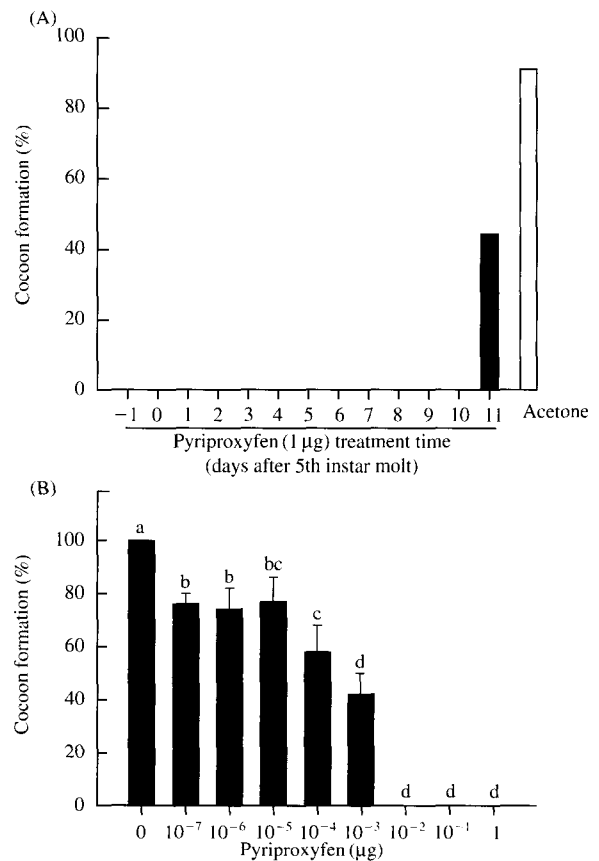


Fig. 3. Inhibitory effect of pyriproxyfen on pupation of *Bombyx mori* (A) on different ages of the fifth instar larvae with $1 \mu\text{g}$ of the JH analog and (B) on 1 day-old fifth instar larvae with different doses. Each treatment consists of 30 individuals. Different letters above the error bars indicate significant difference of the means at Type I error = 0.05 (LSD test).

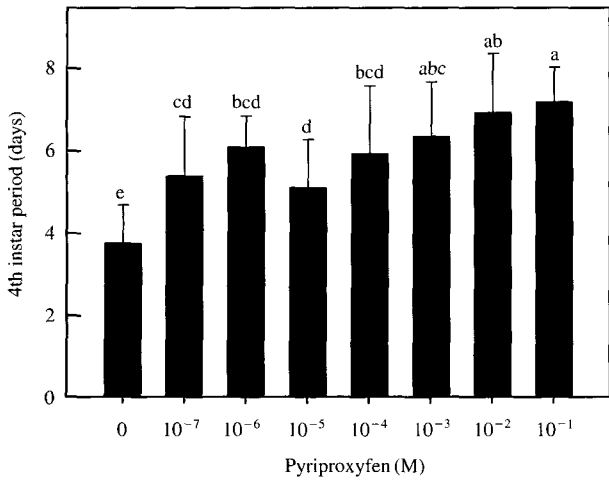


Fig. 4. Effect of pyriproxyfen on developmental period of 4th instar in *Bombyx mori*. The JH analog was applied topically at the newly molted 4th instar larvae. Each treatment consists of 30 individuals. Different letters above the error bars indicate significant difference of the means at Type I error = 0.05 (LSD test).

없이 미화용을 유발할 수 있다는 것을 나타낸다.

피리프록시펜의 변태억제 효과가 처리 약량에 따라 분석되었다(Fig. 3B). 누에 5령 1일차에 변태억제를 보였던 1 µg 이하로 처리한 경우 0.01 µg까지 100% 미화용을 유발시켰다. 그러나 이 이하의 농도에서는 정상 용화가 약량 저하에 따라 증가하였다.

피리프록시펜의 미화용 유발 효과는 이 약제가 JH 유사체로서 작용했다는 것에 유래되며, 이러한 효과는 5령 이하의 유충기 처리할 경우 유충 기간을 연장시킬 수 있다고 기대할 수 있다. 실제로 피해 양잠농가에서는 연장된 유충기간을 또 다른 피해 현상으로 규정하고 있다. 본 연구에서는 다시 4령 초기에 서로 다른 약량의 피리프록시펜을 포피에 국부처리하였다. 처리된 4령충은 모두 대조구에 비해서 유충 기간이 연장되는 것을 알 수 있다(Fig. 4).

누에 혈림프에 존재하는 JHE의 효소 성질이 분석되었다(Fig. 5A). 기질은 HEPTAT로 사용하였을 경우 전형적 Michaelis-Menten 효소반응 형태를 나타냈다. 기질 친화도(K_m)가 76.22 µM, 최대반응 속도(V_{max})가 142.86 µM/min/ml로 측정되었다. 동일한 효소 분석방법으로 피리프록시펜이 처리되었을 경우, 혈림프내 JHE의 활성 변화가 조사되었다(Fig. 5B). 무처리의 경우는 다른 나비목 곤충에서와 같이 종령 초기에 활성 증가를 보이며 5령 5, 6일째에는 낮아지다가 다시 고치를 짓기 직전이 되면 다시 활성이 증가하는 현상을

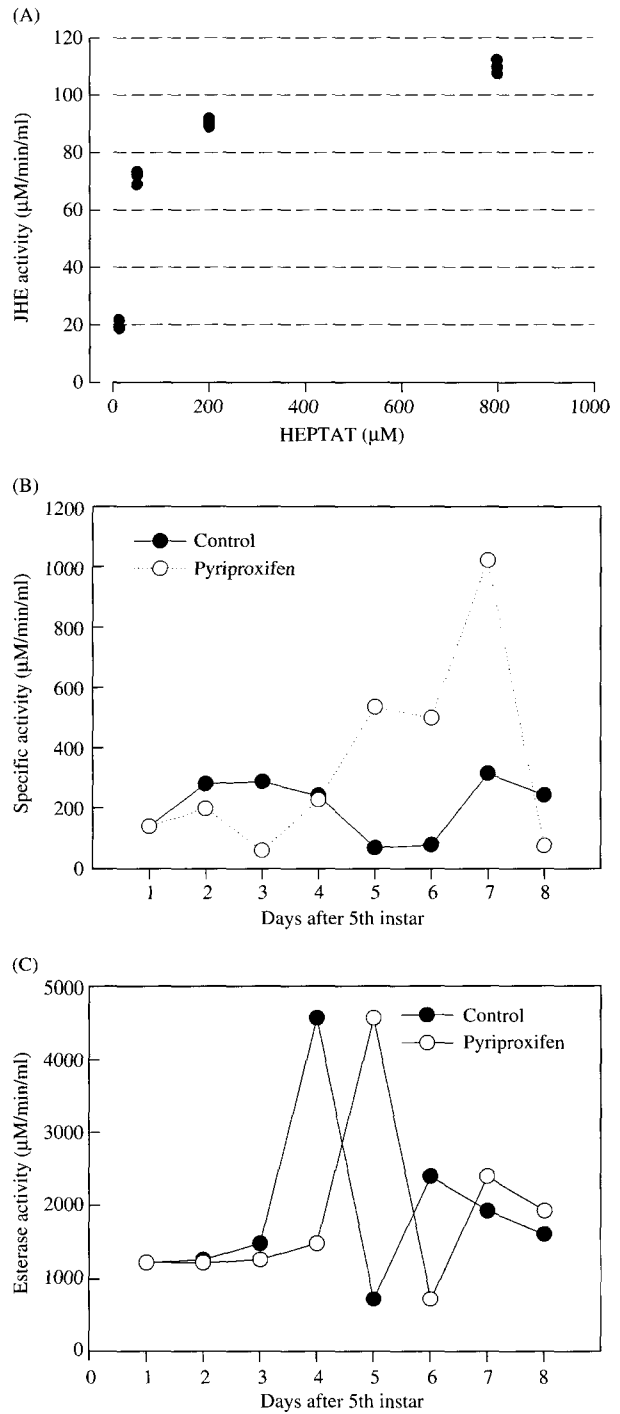


Fig. 5. (A) Enzyme kinetics of juvenile hormone esterase (JHE) in the hemolymph of the fifth instar, *Bombyx mori*. The substrate of JHE was HEPTAT (methyl 1-heptylthioacetothioate). Effect of pyriproxyfen (1 µg) on hemolymph JHE activity (B) and general esterase activity (C) of the fifth instar larvae of *B. mori*.

보였다. Eserine에는 억제능력이 없는 것으로 나타났고, DDVP에 대해서는 10⁻⁷ M 이상의 농도에서 억제

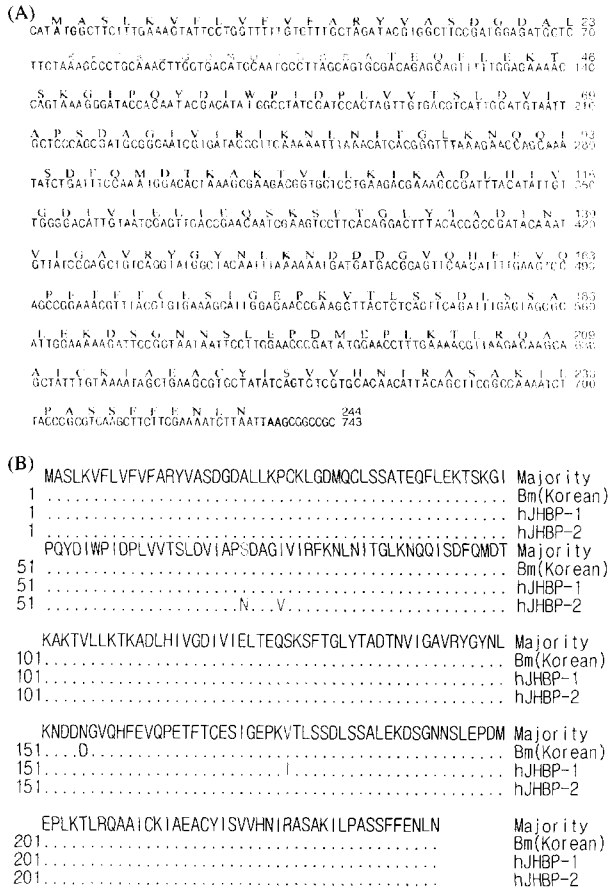


Fig. 6. (A) cDNA sequence and predicted amino acid sequence of a Korean *Bombyx mori* juvenile hormone binding protein (JHBP) (B) Amino acid sequence alignment of JHBPs of Korean and Japanese (hJHBP-1 and hJHBP-2, GenBank database under accession numbers AF098304 and AF098305, respectively) *B. mori* (Bm)

되는 현상을 보였다(미보고자료). 그러나, 피리프록시펜이 처리된 유충은 매우 상이한 활성 양상을 보였다. 약제 처리후 2일째 JHE 활성이 떨어졌다가 다시 증가하여 대조구에 비해 5배까지의 활성을 보였다. 이러한 활성 변화는 일반 에스테라제에서도 확인되었다(Fig. 5C). 그러나 흥미롭게도 일반 에스테라제의 경우는 대조구와 처리구 사이에 활성 크기 차이는 없지만 활성의 변화가 처리구에서 1일 늦게 나타는 현상을 보였다. 이는 다시 종령 유충의 변태 결정시기에 해당할 수 있는 초기 유충기에 에스테라제의 활성도 낮은 것으로 나타나, 이 시기에 유약호르몬의 혈림프내 제거에 문제를 유발할 수 있다는 것을 내포하고 있다.

피리프록시펜 처리에 따른 체내 JH 농도 변동을 알아보기 위한 다른 요인으로서 JH의 혈액 운반체인 JHBP의 유전자 발현을 분석하였다. 우선 국내 누에

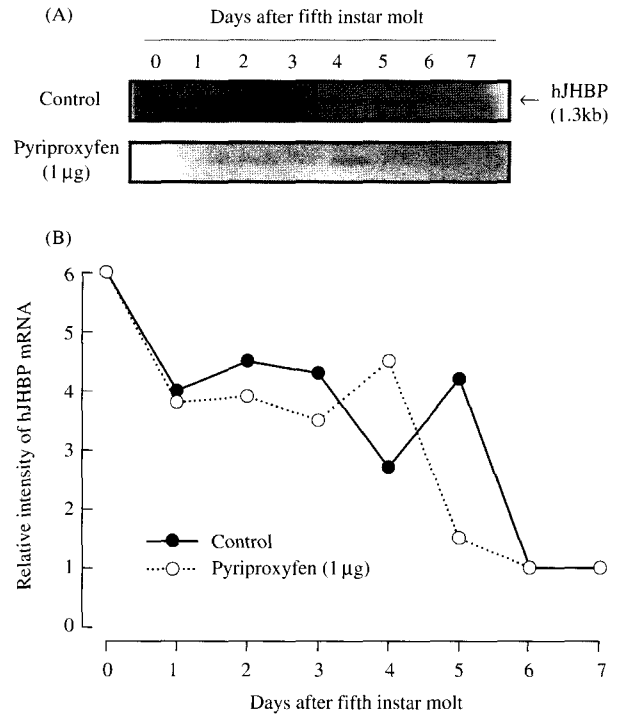


Fig. 7. (A) Northern analysis of the expression of hJHBP (hemolymph juvenile hormone binding protein) in the fifth instar larval of *Bombyx mori* when the larvae were topically applied with pyriproxyfen (1 µg) just after the fifth instar molt. Each lane was loaded with 10 µg of total RNA. (B) hJHBP transcripts (1.3 kb) were quantified in their band intensities by an image analyzer.

품종에 대한 JHBP의 유전자를 기준에 타 품종에서 알려진 ORF 염기서열을 중심으로 클로닝하였다(Fig. 6A). 국내 누에 품종의 JHBP의 ORF 아미노산은 244개로 기준에 알려진 JHBP-1과 JHBP-2와 같은 크기를 보였다. 그러나 아미노산 서열에서 JHBP-1과는 2개, JHBP-2와는 3개에서 각각 차이를 보였다(Fig. 6B). 이 JHBP는 혈중 JH 농도가 올라감에 따라 유전자 발현이 증가하게 된다는 가설하에 이 유전자 발현을 Northern 분석으로 추적하였다. JHBP mRNA가 1.3 kb 영역에서 특이적 발현을 보였다(Fig. 7A). 대조구의 경우 5령 초기 3일째까지 뚜렷한 발현을 보이다가, 4일째 줄고, 다시 5일째 발현을 보이다가 이후 급격하게 발현양이 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 7B). 그러나 피리프록시펜을 처리한 경우 JHBP가 초기의 발현 양 차이를 보이지 않고 5일째까지 일정 수준을 유지하다가 이후 급격하게 줄었다.

몇 가지 농약의 JH 동력제 효과 분석

양잠농가에 직접 또는 간접적으로 노출될 수 있는

농약을 조사하였다. 특별히 이들의 사용시기 및 일반적 내분비계교란의심체에 바탕을 두어 3가지 농약(endosulfan, simazine, alachlor)을 누에의 미화용 유발의심 농약으로 선별하여 분석하였다. 이 이외에 IGR 계통의 tebufenozide와 뽕나무 주변 경작지에 많이 살포되는 제초제의 일종인 molinate를 추가시켜서 JH 동력제 효과가 있는 지 분석하였다. JH 동력제 효과는 난포세포 개방화 효과로 비교 분석하였다(Fig. 8). 특별히, 처리 농약은 실제로 농가에서 살포되는 상용화 제품을 이용하여 분석하였다. 3가지 제초제(simazine, molinate, alachlor) 모두는 JH 동력제 효과를 가지고 있었다. 반

면에 살충제로 사용되는 tebufenozide나 endosulfan은 JH 동력제 효과가 없는 것으로 판명되었다.

고 찰

경북 북부지역의 양잠농가에 피해를 주는 미화용 문제의 발생으로 원인체 규명이 시급한 과제로 대두되었다. 본 연구는 이러한 누에 미화용 유발 원인을 JH 유사체(analog) 또는 동력제(agonist)에 의한 피해로 판단하고, 이를 뒷받침하는 기작 연구와 원인체 스크리닝에 목표를 두었다. 특별히 국외에서는 이러한 누에 미화용 유발체로서 비교적 처리 범위가 넓었던 페녹시카르브를 주요 원인체로 지목하여 왔다(Cappellozza *et al.*, 1995; Kamimura, 1995; Leonardi *et al.*, 1996; Monconduit and Mauchamp, 1998). 그러나 1990년대 중반이후 이 약제가 국내 시판이 되지 않은 상황에서, 양잠농가의 미화용 피해가 발생하였다는 점을 고려할 때, 이 농약을 원인체로 간주하기에는 무리가 있다. 본 연구는 국내에서 시판되는 피리프록시펜을 분석 기준 약제로 정하였다. 이는 이 약제가 일반적으로 파리프록과 딱정벌레류 적용으로 개발되었으며(McMullen, 1990; Langley and Hargrove, 1990; Yamamoto and Kasamatsu, 1990), 국내에서는 온실가루이나 담배가루이 등 시설 재배지에 살포되며, JH 유사체로서 살충기작을 보유하고 있기 때문이다.

피리프록시펜에 의한 누에의 미화용 유발 기작을 분석하기 전에 우선 비화학적 요인이 누에의 미화용 유발에 관여하는 지를 분석하였다. 봄철 누에 농가에서 미화용의 유발이 심각하기 때문에 저온에 의한 미화용 유발인지를 알아 보기 위해 유충 사육 기간동안 사육 온도별 용화율을 비교하였다. 처리된 사육온도에서 모두 누에는 이상없이 용화하였다. 이러한 경향은 실제 야외 저온 조건에서 사육한 결과에서도 유사하게 나타나(Kim, 1993), 저온이 직접적으로 미화용 유발에 원인이 될 수 없음을 제시하고 있다.

또 다른 비화학적 미화용 원인 요인으로 종령 유충의 체중 저하를 제기할 수 있다. 이는 종령기에 완전 변태류 곤충의 경우 두폭이나 체중 등의 다양한 정보를 통해 다음 탈피를 변태로 하는 지를 결정하게 된다(Nijhout, 1975). 본 연구에서 종령 초기의 체중이 다양하게 나타났다. 일부 6령을 거치기는 하였으나 모두 정상적으로 용화하였으며, 종령기간에 있어서도 초기

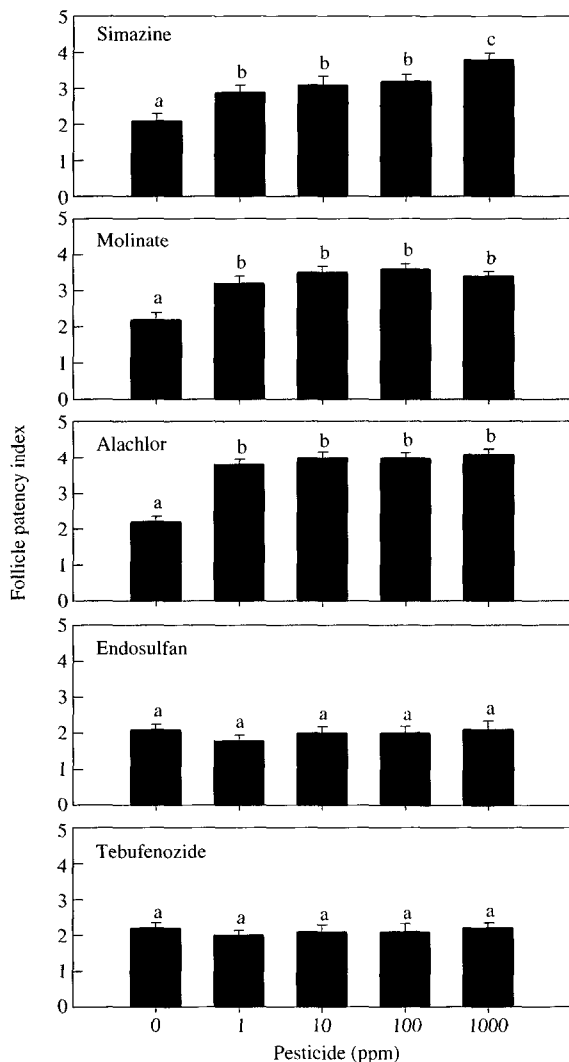


Fig. 8. Screening of commercial pesticides sprayed on the mulberry trees for their juvenile hormone agonist effect assayed by follicle epithelium patency (see Materials and Methods). Each treatment consists of 5 measurements. Different letters above the error bars indicate significant difference of the means at Type I error = 0.05 (LSD test).

체중은 뚜렷한 차이를 보이지 않아, 이 요인도 누에의 미화용 원인 요소로서 간주될 수 없었다.

누에 미화용 생리 기작을 분석하기 위해서 기존에 알려진 사실중 JH 유사체가 미화용 유발을 일으킬 수 있다는 가설에 기초하여 경북북부지역에 실제로 처리되고 있는 JH 유사체 농약인 피리프록시펜을 대상으로 미화용 유발 효과 및 작용 기작을 조사하였다. 누에 유충에 피리프록시펜(1 µg)을 처리한 경우, 4령 초기 처리시 유충기간 연장, 종령 기간에 처리할 경우 영속 유충을 유발하여 미화용을 초래하게 했다. 특히 5령 초기 처리의 경우 0.01 µg의 낮은 농도에서도 용화 억제 효과를 나타내는 것으로 나타나, 섭식에 따른 지속적 노출의 경우 훨씬 낮은 농도에서도 미화용 유발이 가능하다고 추정된다. 유사한 결과가 누에에서 다른 JH 유사체인 페녹시카브에서 보고되고, 이러한 유사체들이 JH 자체보다 훨씬 낮은 농도에서 미화용을 유발시킬 수 있다고 보고하였다(Monconduit and Mauchamp, 1998). 누에의 경우 최종령 초기 3일 동안 JH 혈중 농도가 급격하게 감소하여 4일째에는 검출농도 이하로 낮아지게 된다(Sakurai, 1983; Plantevin *et al.*, 1987). 초기 JH 감소기간 동안 외부로부터 JH 처리는 전흉샘을 완전히 억제시키게 되어, 변태에 요구되는 엑디스테로이드 피크를 형성하지 않아 유충기간 연장 또는 종속유충을 유발하게 된다(Akai and Kobayashi, 1971; Sakurai, 1984; Okuda *et al.*, 1985; Sakurai *et al.*, 1989).

피리프록시펜의 변태 억제 효과는 크게 두 가지 가설에 의해 추론될 수 있다. 우선은 이 약제가 JH 에스테라제를 억제시켜 체내 JH 농도를 잔류하게 하여 변태 프로그램을 억제시킬 수 있다는 가설이다. 그러나 피리프록시펜은 JH 에스테라제를 억제하지 않았으며, 오히려 활성을 제고하였다. 유사한 결과가 페녹시카브에서도 나타났다(Dedos *et al.*, 2002). 활성 제고된 JH 에스테라제는 체내 JH를 오히려 저하시켜주는 데 역할을 수행했을 것으로, 이 시기에 체내 JH 결합단백질의 발현이 줄어드는 양상으로 간접적으로 추측하여 볼 수 있다. 즉, 피리프록시펜의 JH 에스테라제 활성 제고는 직접적으로 누에 변태억제와는 연결시키기 어렵다. 다음 가설로 페녹시카브가 JH 동력제로서 작용하여 체내 JH 농도 교란을 유발했다는 가설이다. 피리프록시펜은 페녹시카브와 유사하게 phenoxyphenyl 화합물 구조를 가지며, 난포세포 개방화를 유도하여 누에에서도 JH 동력제 효과를 지닌다고 볼 수 있다. 이

러한 구조의 화합물로서 기능적으로 유연관계가 먼 척추동물의 갑상선호르몬도 JH 동력제 효과를 보이며, 실제로 난포세포막 JH 수용체에 경쟁적으로 결합력을 보였다(Kim *et al.*, 1999).

이상의 피리프록시펜에 대한 연구결과를 종합하고, 또한 페녹시카브의 연구 결과를 피리프록시펜의 미화용 유발 기작에 외삽하여 본다. 유효농도의 피리프록시펜을 변태 결정을 위한 감수성 시기의 누에에 처리하면, JH 부재시기(감수성시기)에 외부로부터 JH 동력제를 투입시키는 결과이고, 이는 전흉샘의 활성을 억제시키고, 변태에 필수적인 엑디스테로이드 호르몬 생성 및 분비를 막아 종속유충에 이르게 했다고 설명된다. 그러나 피리프록시펜이 누에 미화용 유발에 직접적인 원인체라고 판정하기에는 무리가 있다. 이는 이 농약이 경북북부지역에서 판매량을 기초로 하여 볼 때 (개인 교신자료), 소규모이고 제한적이어서 비교적 광범위하게 나타나고 있는 누에 미화용 사례를 설명하기에는 충분한 설득력을 받지 못한다.

피리프록시펜과 같은 JH 동력제가 누에의 변태를 억제시킬 수 있다는 사실은 경북북부지역의 양잠농가에 피해를 줄 수 있는 화학물들을 스크리닝할 필요가 있다. 이를 위해서는 후보 화합물들을 선별할 필요가 있다. 이를 위해 이 지역에서 가장 많이 노출될 수 있는 화합물이 농약이라는 점과, 이러한 농약 중에 양잠농가와 연관이 될 수 있는 농약을 중심으로 일차 후보 화합물을 선별하였다. 이들 중 본 조사는 3가지 농약 제품이 JH 동력제로서 작용할 수 있다고 판정하였다. 모두 제초제 제품으로서 유효성분이 치오카바메이트계의 molinate, 트리아진계의 simazine, 클로로아세트 아닐라이드계의 atachlor로서 상호 공통적 화학 구조를 지니고 있지는 않다. 그러나 이 세 가지 모두는 현재 내분비계교란후보물질로 알려지고 있다(Keith, 1997). 본 연구에서는 이 세 가지 농약이 난포세포 개방화 분석법을 통해 JH 동력제 효과를 가질 수 있다는 것을 결론내리며, 이들이 누에의 미화용 유발을 일으킬 수 있는 지는 후속 노출시험이 추진되어야 한다.

사 사

본 연구 과제의 중요성을 일깨워 주신 상주대학교 김영섭 교수님께 감사드립니다. 이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었다(KRF-

2002-002-C00101).

Literature Cited

- Abu-Hakima, R. and K.G. Davey. 1977. The action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: the importance of volume changes. *J. Exp. Biol.* 69: 33~44.
- Akai, H. and M. Kobayashi. 1971. Induction of prolonged larval instar by the juvenile hormone in *Bombyx mori*. *Appl. Entomol. Zool.* 6: 138~139.
- Cappelozza, L., S. Cappelozza and G. Sbrenna. 1995. Changes in the developmental programme of *Bombyx mori* caused by oral treatment with fenoxycarb during the last larval instar. *Sericologia* 35: 427~436.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156~159.
- Dedos, S.G., F. Szurdoki, A. Székács, T. Shiotsuki, B.D. Hammock, J. Shimada and H. Fugo. 2002. Fenoxycarb levels and their effects on general and juvenile hormone esterase activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Pest. Biochem. Physiol.* 73: 174~187.
- Garel, J.-P. 1983. Endocrinological aspects of silk production. *Experientia* 19: 461~466.
- Kamimura, M. 1995. Effects of a juvenile hormone analogues, fenoxycarb, on larval growth of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 30: 487~489.
- Keith, L.H. 1997. Environmental endocrine disruptors. A handbook of property data. John Wiley & Sons. NY.
- Kim, D., Y.-I. Lee and Y. Kim. 2004. Juvenile hormone action on vitellogenesis of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 7: 73~79.
- Kim, J.Y. 1997. Plant disease on green-house crops in Kyungbuk province. 42 pp., Master Thesis. Andong National University, Andong, Korea.
- Kim, K., Y.S. Kim and Y. Kim. 2002. A biochemical evidence of the inhibitory effect of diflubenzuron on the metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 5: 175~180.
- Kim, Y. and I. Choo. 1994. Andong agriculture and UR strategy. *Bull. Ag-Tech Inst. ANU.* 1: 23~31.
- Kim, Y., E.D. Davari, V. Sevala and K.G. Davey. 1999. Functional binding of a vertebrate hormone, L-3, 5, 3'-triiodothyronine (T₃), on insect follicle cell membranes. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29: 943~950.
- Kim, Y., D. Kim and J. Lee. 2000. Disturbance of adult eclosion by fenoxycarb, a juvenile hormone mimic, in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 3: 103~111.
- Kim, Y.S. 1993. Study on adaptability of young silkworm reared with artificial diet to natural environment (II). *Res. Bull. Sangju National University* 3: 48~491.
- Kim, Y.S. 2002. Effects of diflubenzuron on the development of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Korean J. Entomol.* 32: 99~106.
- Kim, Y.S. and H.R. Sohn. 2001. Effect of diflubenzuron on silk-gland development of silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Korean J. Seric. Sci.* 43: 77~82.
- Langley, P.A. and J.W. Hargrove. 1990. Control of tsetse fly using pyriproxyfen-baited traps and targets. pp. 403~410, in *Advances in invertebrate reproduction*. Eds. M. Hoshi and O. Yamashita. Vol. 5. Elsevier, Amsterdam.
- Lee, S.W., S.J. Suh, D.A. Kim, K.H. Choi, D.H. Lee and O.H. Ryu. 1996. Questionnaire on status and opinions of pest control to apple growers and its related groups. *RDA. J. Agri. Sci.* 38: 545~552.
- Leonardi, M.G., S. Cappelozza, P. Ianne, L. Cappelozza, P. Parenti and B. Giordana. 1996. Effects of the topical application of an insect growth regulator (fenoxycarb) on some physiological parameters in the fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 113: 361~365.
- McCutchen, B.F., T. Uematsu, A. Székács, T.L. Huang, T. Shiotsuki, A. Lucas and B.D. Hammock. 1993. Development of surrogate substrates for juvenile hormone esterase. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 231~241.
- McMullen, R.D. 1990. A report on pyriproxyfen and fenoxycarb for control of pear psylla, *Psylla pyricola* Foerster. pp. 399~402, in *Advances in invertebrate reproduction*. Eds. M. Hoshi and O. Yamashita. Vol. 5. Elsevier, Amsterdam.
- Monconduit, H. and B. Mauchamp. 1998. Effects of ultralow doses of fenoxycarb on juvenile hormone-regulated physiological parameters in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 37: 178~189.
- Nijhout, H.F. 1975. A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biol. Bull.* 149: 214~225.
- Okuda, M., S. Sakurai and T. Ohtaki. 1985. Activity of the prothoracic gland and its sensitivity to prothoracicotrophic hormone in the penultimate and last-larval instar of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 31: 455~461.
- Plantevin, G., G. Bosquet, B. Calvez and C. Nardon. 1987. Relationship between juvenile hormone levels and synthesis of major haemolymph protein in *Bombyx mori* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86: 501~507.
- Riddiford, L.M. 1978. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *Cen. Comp. Endocrinol.* 34: 438~446.
- Riddiford, L.M. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.* 24: 213~274.
- Riddiford, L.M., K. Hiruma, X. Zhou and C.A. Nelson. 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 1327~1337.
- Sakurai, S. 1983. Temporal organization of endocrine events underlying larval-pupal ecdysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 29: 919~932.
- Sakurai, S. 1984. Temporal organization of endocrine events underlying larval-larval ecdysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 30: 657~664.
- Sakurai, S., M. Okuda and T. Ohtaki. 1989. Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotrophic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Gen Comp. Endocrinol.* 75: 222~230.
- Sevala, V.L., K.G. Davey and G.D. Prestwich. 1995. Photoaffinity labeling and characterization of a juvenile hormone binding protein in the membranes of follicle cells of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 267~273.
- Townson, H. 1972. Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: the genetics and Km values of electrophoretically heterogenous forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 66: 255~266.
- Vermont AMW, M. Kamimura, M. Hirai, M. Kiuchi and T. Shiotsuki. 2001. The juvenile hormone binding protein of silkworm haemolymph: gene and functional analysis. *Insect Mol. Biol.* 10: 147~154.
- Wyatt, G.R. and K.G. Davey. 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.* 26: 1~155.
- Yamamoto, H. and K. Kasamatsu. 1990. Effects of a juvenile hormone mimic, S-71639, on the green house whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*.

leurodes vaporariorum, and the green peach aphid, *Myzus persicae*, in a green house. pp. 393~398, in *Advances in invertebrate reproduction*. Eds. M. Hoshi and O. Yamashita. Vol. 5. Elsevier, Amsterdam.

(Received for publication 26 February 2004;
accepted 10 April 2004)