

곤충의 휴면

고현정^{1,2} · 성수일² · 황재삼^{1*}
¹농업과학기술원 농업생물부, ²수원대학교

Insect Diapause

Hyun-Jeong Go^{1,2}, Su-Il Seong² and Jae-Sam Hwang^{1*}

¹Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, South Korea.

²Department of Life Science, College of Natural science, University of Suwon, Hwaseong 445-743, South Korea.

ABSTRACT

Insect diapause is a delay in development evolved in response to regulatory recurring periods of adverse environmental condition. Diapause has evolved in most insect species to ensure survival under unfavorable environmental conditions and to synchronize of the growth rate of the population. It is not referable to immediately prevailing adverse environmental condition, and thus differs from a delay produced by currently adverse conditions such as low temperatures. This paper was mainly based on the study of Denlinger.

Key words : Diapause, Insect

서 론

곤충은 불리한 환경에서 살아 남기 위한 수단으로서 휴면이라는 기구를 발달 시켰다. 휴면은 불리한 환경 조건의 주기적인 반복에 대한 반응으로 진화되었을 것으로 생각된다. 온대 지방에 사는 곤충은 겨울을 나기 위한 수단으로 그리고 열대지방에 사는 곤충은 주기적인 건기를 극복하기 위한 수단으로 휴면을 이용한다. 또한 휴면을 통해 성충이 동시에 발생하여 교미 빈도를 높여 줌으로써 종족 번식에 아주 중요한 역할을 한다. 곤충의 휴면에 대한 환경적인 조절이나 호르몬에 의한 조절에 대해서는 잘 밝혀져 있지만 휴면의 분자적인 조절에 대한 연구는 미약한 실정이다.

휴면의 개념

휴면은 일시적인 발육 정지인 동면과는 다르게 내분비의 변화에 의한 생리적 변화로서의 발육 정지를 의미하며 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 처음 연구되었다. 휴면은 적절치 못한 환경조건을 극복하기 위해 진화되어온 발생의 정지(developmental arrest) 또는 지연

(delay)이라고 표현 할 수 있다(Chapman, 1998; Denlinger, 2002). 휴면은 곤충의 life cycle의 일부로서 휴면을 위해서는 환경적 징후를 감지하고, 적절한 환경이 올 때 까지 그 정보를 뇌에 저장하고, 그 정보로 야기되는 발생 정지, 억제된 대사 활동에서의 생체 유지, 발생과 생식을 다시 시작할 수 있게 하는 정지 상태 해제 등에 대한 기구를 필요로 한다. 휴면은 호르몬에 의해 개시와 종료를 조절하게 되고 그 외의 여러 환경변화의 징후를 감지하는 다양한 기구들에 의해 조절된다.

일부 곤충은 모든 세대에서 모든 개체가 환경조건의 변화와 무관하게 휴면에 들어가는 경우가 있는데 이것을 obligatory diapause라고 하며 보통 1년에 한 세대만 거치는 *Antheraea yamamai* 이나 *Limantria dispar* 같은 1화성 곤충들이 여기에 속한다. 그 외 대부분의 곤충은 1년이 2세대 또는 그 이상의 세대를 반복하는 종류로서 환경조건의 변화에 민감하게 반응하여 휴면을 결정한다. 이러한 경우를 facultative diapause라고 하며 2화성, 3화성 등의 곤충들이 이에 속한다.

휴면은 미분화된 배자 상태부터 생식이 가능한 성충까지 다양한 단계에서 일어날 수 있지만 종마다 휴면에 들어가는 시기는 다르다. 난 휴면의 경우 보통 메뚜기와 나

*Corresponding author. E-mail: hwangjs@rda.go.kr

비록 곤충에서 볼 수 있는데 같은 난 휴면이라고 해도 어떤 것은 배발생 초기에 미분화 된 배자상태로 휴면에 들어가고 또 다른 것은 배발생이 모두 완료된 유충 상태로 휴면에 들어가기도 한다. 많은 완전변태 곤충의 휴면은 번데기시기에 나타나며 이 시기에는 산소소비가 감소하는 특성이 있다. 유충이 휴면에 들어가게 되면 대개 섭식을 멈추게 되고 성충 휴면의 경우 생식적인 발달이나 교미 행동 구사 등이 이루어지지 않는 특성이 있다. 곤충의 휴면은 발육 정지로 인한 기존의 대사활동이 억제되는 동안 새로운 대사 기작으로 전환되어 유지되고 다시 발생을 시작할 정확한 시간을 결정하게 된다. 휴면의 조절자 역할을 하는 핵심적인 호르몬은 여러가지가 있지만 엄밀히 휴면이 일어나는 발생적 단계와 종에 따라 다르다. 위에서 언급했듯이 곤충의 휴면은 발생단계의 여러 곳에서 일어날 수 있다. 단계별로 나타나는 휴면의 특성을 살펴보면 다음과 같다.

난 휴면은 누에가 대표적인 곤충으로서 미분화된 배자시기에 휴면 조절이 이루어지며 diapause hormone(DH)이라고 하는 neuropeptide hormone이 모체가 용화하여 난형성을 하는 동안 식도하신경절에서 분비되어 난휴면을 유도한다. 또한 휴면란의 배자는 휴면에 들어가면서 난황의 소비도 멈추게 되고 그에 따라 난황 분해와 관련된 효소의 활성도 감소하게 된다. 난 휴면의 다른 종류로 배자의 발육이 완전히 이루어진 유충상태 즉 부화 직전 상태로 휴면에 들어가는 형태의 난휴면이 있다. 그런 이유로 이런 형태의 난휴면을 유충휴면으로 분류하기도 한다. *Antheraea yamamai*(Suzuki *et al.*, 1990)이나 *Limentria dispar*(Lee *et al.*, 1998)가 이에 속하며 이들의 경우 주로 휴면과 관련한 유충의 중장 효소의 연구가 많이 진행되어 있다. *Antheraea yamamai*의 경우는 mesothorax에서 분비된 인자가 배(abdoman)에서 만들어진 발생 촉진 인자(development promoting factor)의 활성을 억제하면서 난 휴면이 이루어진다고 알려져 있다(Suzuki *et al.*, 1990). Suzuki등(1990)은 KK-42라는 imidazole 유도체를 휴면중인 *Antheraea yamamai* 유충에 주사하여 인위적으로 휴면을 종료시킬 수 있었고 이를 통해 유충상태의 난휴면이 떠나 알라타체, 전흉선, 식도하신경절등의 중추신경계와는 독립적인 내분비계에 의해 조절됨을 제시하였다.

유충과 번데기 휴면은 뇌와 전흉선이 억제되어 발생을 진행하는데 필요한 ecdysteroid 합성을 하지 못함으로써 일어나게 된다. 전흉선 자극 호르몬(Protothoracic hormone, PTH)을 분비하는 뇌기능이 정지되거나 또는 저온을 적당히 경험할 때까지 PTH의 영향을 받지 못한 전흉선이 기능을 하지 못하게 되면 성충이 되기 위한 구조가 발달하거나 분화되지 못한다. 나비목 곤충의 유충 휴면에서는

탈피가 정지되고 유약호르몬(Juvenile hormone, JH)의 농도가 증가하는데 다시 말하면, 탈피가 정지되어 유충상태를 유지한 채로 휴면에 들어간다. 휴면이 종료되면 다시 ecdysteroid의 농도가 증가된다. 이를 통해 유충 휴면에 있어 ecdysteroid가 휴면의 유도과 유지 및 종료에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

성충 휴면은 주로 JH 결핍이 원인이다. 곤충에서는 많은 생식과정이 JH에 의해 조절되는데 JH분비가 억제되면서 휴면동안 부속생의 발육이 정지되고 날개 근육이 퇴화되며, 교미와 관련한 활동이 정지된다. 하지만 휴면의 종료와 함께 알라타체가 활성화 되면서 JH가 다시 분비되면 날개 근육이 재생되고, 난 성숙이 시작되며, 교미활성이 증가한다. 이렇듯 각각의 종마다 휴면이 일어나는 시기는 정해져 있다. 하지만 예외적으로 한 세대에 두 번의 휴면을 겪는 곤충들도 있다. *Ades triseriatus*는 첫 번째로 배자 상태로 휴면에 들어가 겨울을 난 뒤 마지막 유충인 4령 때 다시 휴면에 들어가며, *Wyeomyia smithii*의 경우 원래는 3령 유충 때 휴면에 들어가지만 개체에 따라 4령 때도 휴면에 들어갈 수 있다.

그 외에 Diapause-like state라는 것이 있는데 휴면과 관련한 내분비 기관을 적출해 내면 휴면상태가 유도되어 나타나는 상태이다. 이 경우 활성이 있는 관련 내분비 기관의 이식이나 결핍된 호르몬의 투여로 즉시 휴면이 종료된다. 이런 내분비 변화와 관련한 발육정지를 유도하는 downstream signaling system이나 휴면을 지배하는 호르몬 분비의 결정을 지시하는 upstream molecular event에 대해서는 알려진 바가 적다. 현재 hormone receptor, ecdyson receptor(EcR), ultraspiracle(USP)을 암호화 하는 유전자와 휴면과의 연관성이 연구 되고 있다.

1. 휴면의 조절

곤충들은 주로 낮의 길이나 광주기에 영향을 받으며 그 외 온도, 습도나 먹이의 상태 등도 휴면 프로그램에 사용한다. Clock mechanism은 낮의 길이를 구분하는 역할을 하며 counter mechanism은 장일과 단일의 수를 헤아릴 수 있게 하는 기구로서, 현재 밝혀진 clock mechanism 관련 유전자에는 *period*, *timeless*, *dClock*, *cycle*, *doubletime*, *vriille*, *cryptochrome* 등이 있으며 이들은 24시간을 주기로 하는 circadian rhythmicity와 연관된 광수용체(photoreceptor)를 암호화 하는 것으로 알려져 있다(Cashmore *et al.*, 1999; Dunlap, 1999; Hall, 2000; Scotland and Sehgal 2001). 이러한 유전자들은 각각의 곤충들이 휴면에 들어가기 전에 발현이 되는데 가장 극적인 예가 바로 누에의 난 휴면이다. 이 경우 이전 세대의 알이 노출되었던 환경에 의해 다음 세대의 휴면이 결정된다. 휴면 개시를 자극하기위한 감수

기 stage는 종마다 다양하며 그 기간 또한 다양하다. 누에는 배자상태에서 빛이나 온도에 민감하게 반응하고 3령 까지도 약하지만 영향을 받는다. 하지만 나비목 곤충인 *Diatraxia*는 단 2일 간의 빛에도 민감하게 반응하여 휴면을 유도한다.

이런 환경조건을 감지해서 휴면이 결정되었다면 휴면에 들어가기 위한 준비 단계(preparative phase)에 들어가게 된다. 곤충의 휴면에서 휴면 후의 생존 가능성을 증가 시켜야 한다는 측면에서 준비 단계는 아주 중요하다. 예를 들면 많은 번데기 휴면의 경우 휴면에 들어가기 전에 물질을 비축하는 것을 볼 수 있는데 이는 휴면을 하는 동안 살아 남기 위함 뿐 아니라 한번에 휴면을 종료하고 완벽한 변태를 하기 위해 아주 중요하다. 이 시기에 축적되는 단백질을 저장단백질(storage protein)이라고 하며 휴면 시작 직전에 혈림프 내에 저장되었다가 휴면 종료시기가 되면 신속히 혈림프 내에서 사라진다. 이 저장단백질은 혈림프 단백질이라고도 하는데 *Diatraea grandiosella*에서 휴면 관련 단백질로 처음 보고 되었다(Brown and Chippendale, 1978). 그 후 wax moth를 비롯한 여러 나비목 곤충의 유충에서도 발견이 되었다. 이 혈림프 단백질은 hexameric protein으로서 대부분 aromatic amino acid의 함량이 높다. 그래서 이 단백질은 arylphorine으로 정의되며 지방체에서 합성되어 hemolymph로 분비된다. 그리고 휴면 전에 합성되어(*Galleria mellonella*의 경우는 휴면동안 합성) 휴면동안에는 사용되지 않으며 휴면 종료 시 신속히 조직의 발생을 위한 아미노산 source로 사용된다. 이 혈림프 단백질은 발생 단계의 여러 곳에서 발견될 수 있고 비휴면 곤충에서도 보여진다. 하지만 휴면중인 곤충에서는 발생이 정지된 상태이므로 혈림프 내에 풍부하게 존재하지만 비휴면인 경우 곤충의 여러 발생단계에서 신속히 사용된다.

여러 곤충에서 휴면관련 단백질을 암호화하는 유전자도 보고 되었다. *Choristoneura fumiferana*에서는 두 종류의 휴면관련 단백질이 분리되었다. 이 곤충은 2령 유충이 고치를 지으면서 휴면에 들어가는데 이 휴면관련 단백질은 부화 후 바로 축적되기 시작하고 휴면 들어가기 직전에 가장 높은 수준을 보였다가 휴면 동안과 휴면 종료까지는 mRNA의 발현수준이 낮게 유지된다. 이는 휴면 들어가기 전에 합성되며 휴면중이나 휴면 후에는 합성되지 않음을 의미한다(Palli et al., 1998). *Leptinotarsa decemlineata*에서도 휴면과 관련된 세 가지 mRNA 전사체가 분리되었는데 이들은 휴면중인 성충에만 존재하고 비휴면 성충에서는 관찰되지 않는다(Yocum, 2003). 또 *Galleria mellonella*에서는 두 종류의 저장단백질이 밝혀졌는데 이들은 휴면중인 유충의 지방체에서만 합성되었고 휴면동안에만 발현

되는 특성을 보였다(Godlewski et al., 2001). 이러한 사실들을 통해 혈림프 단백질과 휴면과의 관련성을 찾아 볼 수 있다.

그 외에도 휴면중인 곤충은 산소소비 감소 같은 대사활동의 현저한 감소 또는 지질이나 탄수화물 같은 물질의 축적, 탈수나 저온을 견디기 위한 기구 마련 등의 특성을 보인다. 누에의 경우 휴면란에는 비휴면란보다 10%가량 많은 지질을 축적하기도 하며, 일부 번데기 휴면을 하는 나비목과 파리목 곤충에서는 큐티클 층의 hydrocarbon의 양이 크게 증가한다고 알려져 있다. *Manduca sexta*의 경우는 용화 후 보통 4-5일 동안 분비되는 왁스가 휴면을 위해서 10일 동안 분비되고, 또한 쉬파리의 번데기 휴면에서도 휴면중인 번데기가 비휴면중인 번데기보다 hydrocarbon의 양이 두 배 정도 많이 존재한다고 한다. 이는 아마도 수분 손실을 최소화하기 위한 수단일 것이다(Yoder et al., 1992). 그리고 겨울을 나는 곤충에 있어서는 동결방지제 역할을 하는 sorbitol과 glycerol 같은 polyhydric alcohol이 축적된다. 누에의 경우에는 휴면란에 sorbitol이라고 하는 이당류가 축적되는데 난 내 sorbitol 농도의 증가가 실제 휴면과 관련한 배발생 정지의 원인이라고 보는 견해도 있다.

누에의 난 휴면 조절인자로서 밝혀진 DH는 휴면 유도의 핵심 역할을 하는 호르몬으로 24개의 아미노산으로 구성되어 있다(Thr-Asp-Met-Lys-Asp-Glu-Ser-Asp-Arg-Gly-Ala-His-Ser-Glu-Arg-Gly-Ala-Leu-Trp-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH₂). 모체의 번데기 때 식도하신경절에서 분비되어 난 형성 동안 영향을 끼치게 된다. cDNA는 DH, PBAN, 그 외 다른 세 종류의 neuropeptide로 구성된 polyprotein 전구체로서 후에 절단되어 각각의 단백질이 된다. DH와 PBAN 유전자는 합쳐서 DH-PBAN 유전자로 불리며 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성되어 있다. 이 유전자는 식도하신경절 내의 12개의 neurosecretory cell에서 발현되는 것으로 보이며 휴면 유도를 위해 발현되고 최근에는 DH mRNA의 발현이 휴면란을 낳을 모체의 중추신경계와 혈림프 내에 존재하는 고농도의 도파민에 의해 촉진된다는 연구 결과도 있다(Noguchi and Hayakawa, 2001). 합성 DH를 난소가 발생중인 번데기에 주사하면 신속히 trehalase mRNA의 발현이 증가한다. 혈림프 내에서 trehalase는 $\alpha(1,1)$ -glycosidic bond로 이루어진 이당류인 trehalose를 glucose 두 분자로 분해하는 역할을 한다. 이렇게 분해된 glucose는 glycogen으로 재합성되어 성숙된 난 내에 축적된다. Glycogen은 휴면이 시작되면 sorbitol과 glycerol로 분해되어 휴면란 내에 축적되며 이런 polyhydric alcohol은 비휴면란에는 존재하지 않는다. 이렇게 증가된 polyhydric alcohol은 동결방지 역할을 할 것으로 추정되며, 휴면이 종료되면 sorbitol과 glycerol은 다시 glycerol으

로 전환되어 발생 재개에 따른 에너지 생산에 쓰인다(Su *et al.*, 1994; Yamashita, 1996). Ca^{2+} -dependent protein kinase 역시 휴면과의 연관성을 보였는데 난소를 Ca^{2+} 가 없는 조건에서 배양했을 때 DH가 작용하지 못해 trehalase의 활성이 나타나지 않았고 Ca^{2+} -dependent protein kinase inhibitor 인 H7을 첨가하자 trehalase activity가 감소하였다. 이는 DH에 의한 휴면 조절 과정에 Ca^{2+} 가 관여하고 있음을 의미한다(Ikeda *et al.*, 1993). 반면 누에의 휴면유도와 관련하여 핵심적인 역할을 하는 DH가 다른 종에서는 휴면과 무관한 기능을 수행하는 것으로 조사되었다. 예를 들면, 다른 나비목 곤충에서의 DH는 탄수화물 대사의 regulator로서의 역할을 하는 것으로 알려졌고, silkworm의 경우에는 휴면 유도를 위해 DH가 파괴 된다는 보고가 있다. 즉 DH는 누에에서만 휴면과 관련한 기능을 수행하는 호르몬이라고 할 수 있다.

또한 Ecdysteroid는 유충과 번데기 휴면에서 중심역할 하는 것으로 알려져 있다. Ecdysteroid의 표적 기관에는 EcR과 USP가 존재하는데 ecdysteroid는 USP와 dimerization 되어 EcR에 결합한다. *Sarcophaga crassipalpis*에서는 번데기가 되기 전에 ecdysteroid 농도가 증가하고 휴면 시작 전에 EcR과 USP를 암호화하는 유전자도 모두 높게 발현되었다. Ecdysteroid 농도는 휴면 시작 시 급격히 감소했으며 휴면이 끝날 때 까지 다시 증가하지 않아 휴면의 시작과 종료 시에만 EcR이 발현됨을 알 수 있고, 휴면 종료 후에는 더 증가하는 것으로 나타났다. USP 역시 휴면이 시작할 때 발현이 감소하였고 휴면 후기에 다시 나타나는데 이것은 휴면 종료를 유도하는 것으로 보이며 EcR과 마찬가지로 휴면 종료 시 훨씬 더 증가했다(Rinehart *et al.*, 2001). EcR과 USP의 발현 패턴은 *Choristoneura fumiferana*의 2령 유충 휴면에서 보고 되었다. *Chironomus tentans*의 유충 휴면 동안 EcR은 계속 존재하지만 *Manduca sexta*에서는 존재하지 않았으며 같은 곤충에서 EcR의 전사체는 번데기 휴면동안 사라졌다가 휴면 끝나야 발현되는 차이를 보였다(Imhof *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1995).

휴면 유도와 관련한 특이한 예로 앞서 말한 누에의 난 휴면을 들 수 있는데 배자상태의 휴면은 모체에서 이루어지는 DH 분비로 결정된다. 이렇게 모체에서 영향을 받아 다음 세대의 휴면 여부가 결정되는 것을 maternal effect라 한다. DH는 난소에 직접 작용하여 탄수화물과 polyhydric alcohol 함량에 영향을 준다. 다른 maternal effect는 누에의 경우보다는 덜 직접적이며 벌목과 파리목의 여러 종에서 보고된 것처럼 다음 세대의 번데기와 유충의 휴면 능력을 결정할 수 있다. *Sarcophaga bullata*에서 γ -aminobutyric acid(GABA)와 octopamine은 모체에서 자손으로의 정보전달에 관여할 가능성이 있다고 한다(Webb and Denlinger,

1998). 하지만 maternal effect는 단백질의 기능으로 설명될 뿐 그것의 분자적 이해는 부족한 실정이다.

2. 휴면동안의 유전자 발현 양상

휴면 관련 유전자 발현은 곤충체의 많은 조직에서 관찰되고 있지만 특히 뇌는 휴면 프로그램의 보고로서 가장 흥미롭다고 할 수 있다. Joplin 등(1990)은 pulse labeling과 이차원 전기영동으로 휴면 개체와 비휴면 개체의 뇌에서 활발히 합성된 단백질을 조사하고 대조함으로써 휴면은 여러 유전자의 silencing과 관련 되어 있고 적은 수의 유전자들이 이시기에 독특하게 발현된다는 결론을 내렸다. 쉬파리를 사용한 이 연구에서는 비휴면 번데기의 뇌에서 300개 이상의 단백질이 발견되었고 휴면 번데기의 뇌에서는 180개 정도의 단백질 발견되었다. 휴면중인 번데기의 뇌에서는 적은 수의 유전자가 발현되는 것으로 결론을 내렸지만, 14종의 단백질은 휴면중인 번데기의 뇌에서만 발견되었다. 이는 휴면동안 유전자 발현이 억제될 뿐 아니라 일부 유전자는 독특한 set으로 발현됨을 의미한다. 비휴면 번데기의 뇌에서 발현된 단백질의 40%가 휴면동안 불활성 상태이고, 휴면동안 발현된 유전자의 10%가 독특하게 이 시기에만 발현되는 것으로 조사되었다. 이 결과는 많은 유전자가 휴면동안 단순히 turn on/off 되는 것이 아니며 휴면과 관련한 유전자의 발현 패턴은 더 복잡함을 보여준다.

Denlinger(2002)는 휴면과 관련하여 발현하는 유전자들을 크게 4가지로 구분하여 설명하였다. 휴면과 무관하게 일정하게 발현하는 유전자, 휴면 동안 발현이 억제되는 유전자, 휴면동안 발현이 증가하는 유전자, 휴면동안 간헐적(주기적)으로 발현되는 유전자가 그것이며, 휴면동안 발현이 증가하는 유전자는 다시 휴면 초기동안에 발현되는 유전자, 휴면 후기에 발현되는 유전자, 그리고 휴면 내내 지속적으로 발현되는 유전자의 3가지로 소 분류하였다. 그림 1은 쉬파리의 번데기 휴면동안 다양한 양상으로 발현되는 여러 유전자들을 보여주고 있다.

1) 휴면과 무관하게 발현되는 유전자

Protein pulse labeling을 통해 쉬파리의 비휴면 번데기의 뇌에서 합성되는 단백질이 휴면 번데기의 뇌에서도 합성됨을 확인하였다. Northern blot 방법으로 휴면과 비휴면 개체의 뇌에서 발현되는 mRNA 수준을 비교하였는데 실험대상 clone의 과반수 이상이 휴면과 비휴면 개체에서 모두 발현하였고 쉬파리의 heat shock 70 cognate gene, 28s ribosomal protein, cell cycle regulators cyclin E, p21, p53은 휴면 전중후의 뇌 뿐 아니라 비휴면 번데기의 뇌에서도 발견되었다(Tammariello and Denlinger, 1998; Rinehart *et al.*, 2000; Rinehart *et al.*, 2001). ecr은 지속적

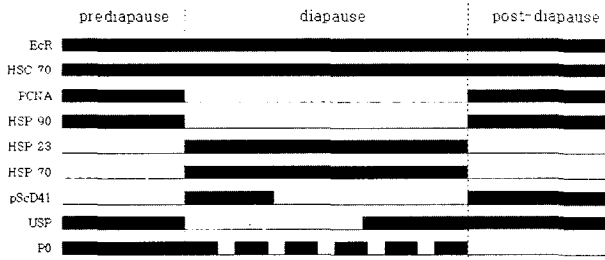


Figure 1. Representative patterns of gene expression noted in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* in relation to pupal diapause. Proteins encoded by the genes are indicated on the left of the diagram. Categories include genes that are not influenced by diapause (*ecr* and *hsc70*), genes that are diapause downregulated (*pcna* and *hsp90*), genes that are upregulated throughout diapause (*hsp23* and *hsp70*), early diapause genes (*pScD41*), late diapause genes (*usp*), and genes expressed intermittently during diapause (*po*).

으로 발현되며 발현 수준은 휴면 직전과 직후에서 약간 더 높았다. *Choristoneura fumiferana*의 GST mRNA는 2령 유충 휴면 전에 high level로 발현되어 휴면 내내 지속되며 휴면 종료 후 감소하기 시작했다. 같은 종에서 ubiquitin과 Hsp70의 mRNA는 휴면 전 중 후 모두에서 발현되었다(Palli *et al.*, 1998).

2) 휴면과 관련하여 발현이 감소하는 유전자

쉬파리의 번데기 뇌의 단백질을 아차원 전기영동과 pulse labeling을 사용하여 분석하고 그에 관련된 mRNA들을 Northern blot 방법으로 분석한 결과 휴면과 비휴면 번데기의 뇌에서 모두 높은 수준으로 발현되는 유전자가 많음을 알 수 있었다. 그 다음으로 풍부한 종류는 휴면 동안 발현이 감소되는 유전자로 휴면 동안 억제되는 유전자는 발육정지나 대사감소로 일어나는 단순한 downstream event로 조절이 거의 이루어지지 않는다고 할 수 있다. 예를 들면, *Choristoneura fumiferana*의 미토콘드리아의 phosphate transport protein은 휴면 동안에는 낮은 mRNA의 발현수준을 보였는데 이는 ATP 합성을 위해 미토콘드리아로 옮겨진 phosphate가 적다는 것을 의미한다(Lee *et al.*, 1998). 다른 예로 *Limentria dispar*의 많은 중장 효소의 활성 감소와 쉬파리의 hsp90을 암호화하는 유전자가 휴면 전후에는 발현이 증가한 반면 휴면 동안에는 발현이 감소한다는 결과 역시 이와 같은 경우라 하겠다.

이러한 조절의 핵심과정은 유전자의 발현 억제로 설명할 수 있다. 쉬파리의 경우 휴면동안 세포주기 조절인자가 억제되는데 proliferating cell nuclear antigen(pcna)은 휴면 시작 시 발현이 억제되어 종료 시까지 발현이 안 된다. 휴면중인 쉬파리 번데기의 뇌세포는 세포주기 중 G₀/G₁ 사이에서 정지된다고 한다. 여러 cell cycle regulator(cyclin E, p21, p53)가 휴면에 의해 발현 패턴이 변하지 않지만,

pcna는 휴면으로 인한 세포 분열 억제와 함께 발현이 억제된다. 모든 휴면에서 cell cycle이 정지되고 발육정지가 일어나는 단계는 종마다 다르다(Champlin and Truma, 1998). *Manduca sexta*의 번데기휴면에서 optic lobe anlagen은 G₂기에 정지되고 누에의 난 휴면을 하는 배지는 G₂기에서 세포분열이 정지된 상태로 휴면에 들어간다. 이와 관련하여 cdc2-regulate Ser/The kinase 비롯한 G₂/M transition을 조절하는 여러 유전자가 누에에서 클로닝 되기도 하였다(Iwasaki *et al.*, 1997).

3)휴면 동안 발현되는 유전자

첫 번째로 휴면 내내 발현되는 유전자는 쉬파리에서 subtractive hybridization을 이용해서 처음 분리 되었으며 그것이 바로 small hsp23이었다. 비휴면 번데기에서는 heat이나 cold shock과 같은 환경 stress에 반응하여 발현되었지만 휴면중인 번데기에서는 휴면에 들어가면서 발현이 증가 되었다. Hsp 23은 휴면 시작 시 빠르게 발현이 시작되었다가 휴면 종료 후 다시 빠르게 발현이 억제되었다. 비휴면 번데기의 경우에는 hsp23의 발현이 환경 stress에 반응하여 증가하지만 번데기가 휴면에 들어갈 때는 환경 stress와 무관하게 발생학적으로 발현이 증가함을 보고 하였다(Yocum *et al.*, 1998). Hsp70 family는 거의 모든 시기에 발현되고 발현 수준은 휴면에 영향을 주지 않고 나타난다. 예를 들면, 쉬파리 번데기 휴면에서의 hsp70은 휴면 시작 시에 발현이 증가하고 휴면 종료 시 신속히 감소했다. Hsp70의 발현수준은 조직마다 다르지만 hsp23과 hsp70 모두 뇌에서 가장 높은 발현 수준을 보였고 그 다음은 표피와 중장이었다. 반면, 지방체에서는 거의 발현이 안 되는 것으로 나타났다(Denlinger *et al.*, 1992).

휴면동안 발현되는 유전자의 두 번째 종류는 휴면 초기에서 발현되는 유전자들이다. 이런 유전자의 어떤 것은 휴면 초기에서 짧은 기간동안만 발현하는 반면 또 다른 것들은 휴면이 좀더 진행된 시점에서 지속적으로 발현되는 것들도 있다. 휴면초기에 발현되는 유전자는 여러 가지 면에서 흥미롭다고 할 수 있다. 이 유전자들은 발생과정의 정지와 관련된 유전자를 대신하거나 발현에서 그들이 감소하는 순간에서 휴면의 새로운 단계로의 전환점을 구분할 수 있게 해주기 때문이다. 쉬파리의 번데기는 휴면 종료 후의 에너지 사용을 위해 지질을 비지질 성분으로 전환하여 비축한다. 휴면의 초기 단계와 관련된 유전자는 번데기가 휴면 후기 단계로 갈수록 억제된다. 휴면 초기에 발현되는 어떤 유전자가 억제(shut down)된다는 것은 휴면 종료를 위한 발육저해의 해제와도 관련이 있다. 휴면 중인 쉬파리의 번데기 뇌의 mRNA를 subtractive hybridization을 통해 분리하여 얻은 clone pScD41은 휴면에 들어간 처음 한 달 동안만 높은 수준으로 발현되고 그

후에는 사라진다고 보고 되었다. 휴면 초기에서 발현되는 잠재적인 역할은 밝혀지지 않았지만 이러한 유전자가 쉬파리에만 유일하게 존재하는 것은 아니다. 누에에서도 *samui* 라고 하는 cold-inducible gene이 발견되었고 *Limantria diapar*의 중장과 후장에서 휴면 초기에 휴면 특이적으로 발현되는 55 kDa protein이 밝혀져 있다. 이 두 유전자 모두 저온에 처리한 후 나타났다가 30일 또는 100일정도 경과하자 사라지는 특성을 보였다(Lee and Denlinger, 1996; Moribe et al., 2001).

마지막으로 휴면동안 발현이 증가되는 유전자 가운데 휴면 후반기에 주로 발현되는 유전자는 휴면의 완결, 휴면 후반기의 독특한 변화 또는 발생회복 등에 기여하는 것으로 보인다. 쉬파리의 *usp* 유전자는 휴면 후기에 발현되는 유전자의 하나로 휴면 초기의 발현수준은 낮으나 휴면 후기에서는 발현 수준 증가한다. *usp*는 ecdysone receptor로서의 기능을 하는 단백질을 암호화하는데 ecdysteroid의 반응성 증가와 동시에 발현이 증가한다. 휴면 후기의 *usp* 발현은 휴면말기에 분비되는 ecdysteroid에 반응할 수 있게 하는 준비단계일지도 모른다. 누에의 sorbitol dehydrogenase(SDH)는 가장 잘 연구된 휴면 후기 발현 유전자의 예로서 *sdh* 유전자의 활성은 배발생의 회복 및 완성 그리고 휴면을 종료할 수 있게 하는 기작과 관련되어 있는 것으로 보인다(Niimi et al., 1993). 또 다른 유전자는 *Choristoneura fumiferana*의 defensin으로 이것은 미생물 감염에 저항하는 단백질이다. 이 유전자의 발현은 휴면중인 유충 내에 미생물 또는 박테리아 침입 시 방어를 위해 발현되는 것으로 보인다(Palli et al., 1998).

4) 휴면동안 간헐적(주기적)으로 발현 하는 유전자

휴면동안의 어떤 대사활동은 주기적이다. 특히 산소소비와 관련한 infradian cycle을 보이는 쉬파리와 일부 다른 종에서 뚜렷하게 나타난다. Infradian cycle이란 생물학적 주기가 1일 1회 미만인 cycle로 쉬파리에서의 산소소비는 산소소비 증가하는 1-2일 내의 기간에 간신히 관찰할 수 있다. 25°C에 4일 정도의 주기성을 보이거나 온도가 낮아지면 cycle이 더 길어진다. 휴면 초기에는 cycle 짧다가 휴면중기가 되면 초기보다는 증가해서 cycle이 길어진다. 그리고 휴면 후기에는 다시 이 cycle이 짧아진다. 이러한 대사활동의 전환에 대한 명확한 근거는 알려지지 않았다. 하지만 ATP 생산을 위해 계속 대사활동을 하는 것 보다는 주기적인 활성이 더 효율적일 것이다. 쉬파리의 휴면 번데기의 뇌에서 분리된 60S ribosomal protein P0는 휴면 동안발현이 증가하는 유전자로 휴면 동안의 발현이 간헐적이며 산소 소비 cycle과 연관되어 있음이 보고 되었다. 낮은 수준으로 산소 소비하는 몇 일 동안은 강하게 발현 하다가 높은 산소 소비를 보이는 몇 일 동

안은 적게 발현 된다. 이런 종류의 단백질은 multifunctional, AP3 endonuclease activity와 연관된 DNA repair와 60S ribosome의 효율적인 단백질 번역과정을 위해서 중요할 것이다(Craig and Denlinger, 2000).

5) Stress responsive genes

휴면동안 발현되는 것으로 보고 된 또 다른 종류는 stress에 대한 반응으로 인해 발현되는 유전자 들이다. 이런 유전자는 보통 휴면동안에는 발현이 안 되지만 환경적 stress를 주면 발현 된다. 이러한 예로 대부분의 defense mechanism을 들 수 있는데 휴면 동안 발현이 그대로 유지된다. 휴면 중인 곤충에 물리적인 상처를 주면 신속히 대사량이 증가되고 이 증가된 대사활동이 나타내는 상처 치료에 대한 반응은 healing mechanism과 관련된 유전자의 발현을 증가시킨 결과일 것이다(Harvey and Williams, 1961). Stress에 의해 억제되는 유전자도 있겠지만 현재 예는 없다.

Immunoglobulin superfamily member 중 하나인 hemolin은 *Halophora cecropia*의 휴면 번데기의 혈림프에서 처음 보고 되었다(Faye et al., 1975). 곤충체내 박테리아 주사 후 몇 시간 이내에 휴면중인 번데기의 지방체는 hemolin을 합성해서 혈림프로 분비하였다. 혈림프는 hemolin이 bacterial LPS와 결합하는 곳으로 phagocytosis의 효율을 증가시킨다. Sarcotoxin은 attactin family의 항세균 단백질로서 쉬파리의 휴면중인 번데기에 박테리아를 주사 했을 때 발현이 증가되었다(Natori et al., 1999). 이렇게 곤충의 면역반응에 관련된 단백질을 암호화 하는 유전자는 휴면 동안 stress에 대한 반응성을 유지하게 해준다. 쉬파리에서 휴면중인 번데기가 cold shock을 경험하게 되면 hsp70과 hsp90의 유전자의 발현이 증가한다. *Eurosta Solidagainis*의 휴면중인 유충에서 heat shock protein은 cold가 아닌 heat shock에 대한 반응으로 만들어 진다고 보고 되었고(Lee et al., 1995), *Limantria dispar*에서는 휴면중인 1령 유충은 heat shock과 cold shock 모두에 반응하여 heat shock protein을 생산한다고 한다(Denlinger et al., 1992). *Drosophila triauraria*에서도 휴면중인 성충은 hsp70 mRNA 축적으로 heat shock과 cold shock에 반응한다고 한다(Goto et al., 1998). 조사된 대부분의 경우에서 hsp transcript는 휴면 관련 단백질의 일부로서 이미 증가되거나 저온에 대한 반응으로 휴면중인 곤충에서 증가됨을 알 수 있다.

3. 휴면의 종료

휴면은 크게 3단계로 나눌 수 있다. 휴면에 들어가기 전단계로 빛이나 온도에 민감하게 반응하는 sensitive stage와 물질 비축시기인 preparation stage가 이에 속하고 본격적으로 휴면에 돌입해서 휴면을 유지하는 단계가 그 두 번째로 휴면 돌입 후 일정 기간 동안 휴면을 완성하게 된

다. 마지막은 휴면을 종료하고 발생을 재개 하는 단계로서 곤충들은 휴면을 깨기 위한 조건을 충족하지 못하면 휴면을 종결할 수 없다. 휴면을 종결하기 위한 조건이란 자연 상태의 겨울과 같은 조건을 말하는데 누에의 경우 2-3개월 이상의 저온(2-5°C)을 경험해야만 휴면을 종료하고 발생을 재개 할 수 있다. 겨울을 나는 대부분의 곤충은 누에처럼 일정기간의 저온을 필요로 한다. 일단 휴면이 완성되었다고 해도 이런 조건을 만족하지 못하면 곤충은 절대로 휴면을 깨고 발생을 재개 할 수 없다. 휴면을 끝내고 발생을 시작할 준비를 할 수 있는 때를 휴면이 각성 되었다고 표현한다. 일정 기간의 저온을 포함한 각성을 거친 후 곤충이 살아가기 적당한 온도에 보존하게 되면 대사율이 증가하면서 신속히 발생이 진행된다. 그리고 특정 화학 물질의 처리로 휴면을 인위적으로 종료할 수도 있다. 누에의 경우 산란 후 20시간째인 휴면란에 염산을 처리하면 휴면에 들어가는 것이 방해되어 발생이 지속적으로 진행 된다. 이 때 염산이 난 내로 침투하게 되면 난황의 배자 단백질 합성계에 영향을 주어 배자가 발생을 하게 되고 특히 esterase isozyme의 활성을 자극하는 것으로 밝혀져 있다. Esterase는 난황의 분해와 관련한 효소로서 휴면으로 정지되어 있던 난황 분해가 이루어지게 된다. 또한, 휴면에 들어가면 난각이 비휴면란에 비해 두꺼워지고 산소소비도 감소하게 되는데 휴면란의 난각을 제거해 배자가 산소와 접촉하도록 해주면 휴면이 종료되어 발생을 재개 하게 된다. 난휴면을 하는 *Teleogryllus commodus*의 경우 휴면란에 urea 용액이나 암모니아 가스를 접촉시키면 휴면을 종료하게 되는데 그 이유는 아직 밝혀지지 않았다. 또한 *Atrachya menetriesi*도 난휴면을 하는 곤충으로서 염화수은 용액에 휴면란을 담그면 수은 이온이 난각에 작용하여 산소의 투과성을 증가시켜주어 휴면을 종료 시키는 것으로 알려져 있다. 이렇게 여러 가지 화학 물질을 이용한 인위적인 휴면의 종료방법이 알려져 사용 되고 있으며 이는 곤충 사육에 있어 중요한 수단이다.

취파리의 경우에는 저온 경험 후에 고온을 감지해 휴면을 종료하게 되는데 무조건 고온을 처리한다고 해서 휴면이 깨지는 않는다. 고온에 반응하는 능력은 초여름이 되어서 완전해 진다고 한다. 이러한 특성은 휴면(diapause)와 휴면 후(post-diapause) 사이의 구분을 정하는 계기가 되었다. 이 두 상태에 있는 곤충은 생리적으로는 동일하다. 발생학적 수준에서는 구분이 불가능 하지만 분자수준에서는 구분이 가능하다. 앞에서 언급했던 usp 같은 유전자가 휴면 후반부에 발현되거나 휴면 후반부에 어떤 유전자의 발현이 억제되는 현상이 일어날 것이다. 아마 diapause나 post-diapause 중 하나에서 유전자 발현의 양상에 주된

변화가 보이게 될 것이다. 휴면이 각성 되면서 발생을 억제하기 위해 풍부하게 발현되던 유전자들은 발현이 억제되고 재개되는 발생을 위해 억제되었던 유전자나 발생에 관련한 새로운 유전자들의 발현이 증가하게 될 것이다. 하지만 이런 변화가 일어나는 시점을 정확히 구분하기는 힘들다. 핵산(Haxame)은 휴면 각성을 위한 처리의 하나로 이런 시점에 일어나는 변화를 확인하는데 사용되었다. 취파리에서 휴면동안 발현이 증가하는 유전자인 hsp23과 hsp70은 핵산 처리 후 6시간 경 모두 발현이 억제되었다. 반면 휴면동안 억제되는 유전자인 hsp90은 휴면 종료 후 12시간 경 높은 수준으로 다시 발현되었다. pcna 역시 휴면동안 억제되는 cell cycle regulator로 핵산 처리 후 12시간 내에 15배로 발현이 증가했고 그 후 바로 정상상태였던 뇌세포에서 cell cycle이 재개되었다. 취파리에서 EcR과 USP를 암호화하는 유전자의 발현수준은 핵산 처리 후 증가를 보였다. EcR mRNA는 핵산 처리 후 1시간 내에 발현이 증가했으며 USP mRNA는 핵산 처리 후 9시간 경 발현이 증가하였다. 이런 EcR과 USP mRNA 발현의 증가는 핵산 처리에 따른 ecdysteroid의 증가와 서로 관련이 있을 것으로 보인다. 핵산 처리로 휴면과 휴면 후에서 일어나는 여러 분자적인 변화를 연구할 수 있었다.

휴면의 종료 시기에는 발생을 재개하면서 새로운 조직의 구성과 새로운 대사산물의 활성과 관련하여 단백질의 양상이 변하게 된다. 휴면을 위해 저장되었던 storage protein은 조직의 구성을 위한 하나의 아미노산 공급원으로 이용함으로써 혈림프 내에서 신속히 감소하게 된다. *Limantria dispar*의 경우 휴면동안 낮은 활성을 보이던 trypsin, chymotrypsin, elastase, amino peptidase, 그리고 esterase와 같은 소화 효소들의 활성이 휴면 종료와 함께 신속히 증가하게 된다. 반면 alkaline phosphatase는 휴면 시작 시 빠르게 증가하고 휴면 내내 그 수준을 유지하지만 휴면이 종료되고 부화가 이루어지면 발현이 감소하는 특성을 보인다.

이렇게 휴면은 복잡한 분자적인 변화와 생리적인 변화를 수반하는 현상으로 곤충이 살아가는데 꼭 필요한 전략 중의 하나이다. 일본을 비롯한 여러 아시아 국가들은 주로 누에의 휴면에 대한 연구를 진행하고 있으며 미국이나 유럽등지에서 다양한 곤충들의 휴면을 분자생리적 수준에서 연구하고 있다. 한편, 국내에서도 누에를 비롯한 여러 곤충의 휴면과 관련한 연구들이 이루어지고 있지만 일본이나 서양 국가들에 비해서는 그 연구 내용이 미흡한 편이다(Hwang et al., 2004 ; Go et al., 2004). 휴면과 관련된 유전자나 단백질을 분리하고 동정하는 방법으로 현재 subtractive hybridization, differential display, 이차원 전기영동 등이 수행되고 있다. 이러한 방법으로 분

리된 유전자의 기능은 mutation, antisense oligonucleotide interference나 RNAi(RNA interference) 와 같은 기술을 통해 밝혀질 수 있다. 휴면 관련 유전자 및 단백질을 동정하여 기능을 밝히는 것만큼 휴면의 조절과 관련된 기작을 이해하는 것도 중요하다. 휴면은 곤충이 악조건 속에서도 살아 남게 해주는 수단으로서 휴면의 조절 기작을 이해한다면 익충의 산업화뿐만 아니라 병충해 방제에도 큰 기여를 할 것으로 생각된다. 곤충뿐만 아니라 식물과 그 외 다른 무척추 동물에서도 휴면이 연구되고 있으며 곤충의 성충 휴면의 경우 일부 나비목과 여러 메뚜기, 그리고 다양한 파리목 곤충에서 노화와 관련되어 연구되고 있다(Tatar and Yin, 2001). 이러한 연구는 나아가 휴면의 특성인 발생의 정지와 해제 등과 관련한 노화의 분자적인 연구와도 부합될 것으로 생각된다.

인용문헌

- Brown, J. J. and G. M. Chippendale (1978) Juvenile hormone and a protein and a protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Insect Biochem.* **8**: 359-67.
- Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, Y. J. Wu and D. Liu (1999) Cryptochromes : blue light receptors for plants and animals. *Science.* **284**: 760-65.
- Champlin, D. T. and J. W. Truman (1998) Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development.* **125**: 269-77.
- Chapman, R. F. (1998) *The Insects: structure and function*, Cambridge university press, 4th edn. p. 403-408.
- Chippendale, G. M. (1998) Role of proteins in insect diapause. In *Endocrinological Frontiers in Physiological Ecology*, (ed.) F. Sehna, A. Zabza, D. L. Denlinger, pp331-46. Wroclaw, Pol.: Wroclaw Tech. Univ. Press
- Craig, T. L. and D. L. Denlinger (2000) Sequence and transcription patterns of 60S ribosomal protein PO, a diapause-regulated AP endonuclease in the fresh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Gene.* **255**: 381-88.
- Denlinger, D. L. (2002) Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 93-122.
- Denlinger, D. L., R. E. Lee, G. D. Yocum and O. Kukal (1992) Role of chilling in the acquisition of cold tolerance and the capacitation to express stress proteins in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **21**: 271-80.
- Denlinger, D. L., J. P. Reinhart and G. D. Yocum (2001) Stress proteins: a role in insect diapause? *Insect Timing: circadian Rhythmicity to Seasonality*. Amsterdam: Elsevier. pp. 155-71.
- Dunlap, J. C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-90.
- Faye, I., A. Pye, T. Rasmuson, H. G. Boman and I. A. Boman. (1975) Insect immunity. II. Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalopora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect. Immunol.* **12**: 1426-38.
- Fujiwara, H., M. Jinsra, R. Newitt, S. R. Palli, K. Hiruma and L. M. Riddifords (1995) Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**: 881-97.
- Go, H. J., J. S. Hwang, Y. T. Kim, H. S. Kim, S. W. Kang, J. S. Chang, S. M. Lee, B. H. Lee and S. I. Seong (2004) Analysis of diapause -associated changes in Silkworm Egg proteins. *Int. J. Indust. Entomol.* **9**(1): 117-121.
- Godlewski, J. J. Ludkiewicz, K. Grzelak and B. Cymborowski (2001) Expression of larval hemolymph proteins (Lhp) genes and protein synthesis in the fat body of greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae during diapause. *J. Insect Physiol.* **47**: 759-66.
- Goto, S. G., K. M. Yoshida and M. T. Kimura (1998) Accumulation of Hsp 70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *J. Insect Physiol.* **44**: 1009-15.
- Hall, J. C. (2000) Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**: 456-86.
- Harvey, W. R. and C. M. Williams. (1961) The injury metabolism of the Cecropia silkworm. I. Biological amplification of the effects of localized injury. *J. Insect Physiol.* **7**: 81-99.
- Hwang, J. S., H. J. Go, T. W. Goo, E. Y. Yun, I. Kim, N. A. Kim, K. H. Choi, S. I. Seong, S. K. Kim, S. M. Lee and S. W. Kang (2004) Construction of the full-length cDNA Library and selection of diapause-associated cDNA clones from *Bombyx mori* diapausing eggs and diapause activated eggs. *Int. J. Indust. Entomol.* **9**(1): 145-148.
- Ikeda, M., Z-H. Su, K. Imai, Y. Sato, M. Isobe and O. Yamashita (1993) Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori* by synthetic diapause hormone. *J. Insect Physiol.* **39**: 889-95.
- Imhof, M. O., S. Rusconi and M. Lezzi (1993) Cloning of a *Chironomus tentans* c DNA encoding a protein (cEcRH) homologous to the *Drosophila melanogaster* ecdysteroid receptor(dEcR). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**: 115-24.
- Iwasaki, H., M. Takahashi, T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma (1997) Cloning of cDNAs encoding *Bombyx* homologues of Cdc2 and Cdc2-related kinase from eggs. *Insect Mol. Biol.* **6**: 131-41.
- Joplin, K. H., G. D. Yocum and D. L. Denlinger (1990) Diapause specific proteins expressed by the brain during the pupal diapause of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* **36**: 775-83.
- Lee, K. Y. and D. L. Denlinger (1996) Diapause-regulated proteins in the gut of pharate first instar of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and the effect of KK-42 and neck ligation on expression. *J. Insect Physiol.* **42**: 423-31.
- Lee, K. Y. and D. L. Denlinger (1997) A role for ecdysteroids in the induction and maintenance of the pharate first instar diapause of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *J. Insect Physiol.* **43**: 289-96.
- Lee, K. Y., A. P. Valaitis and D. L. Denlinger (1998) Activity of

- gut alkaline phosphatase, proteases and esterase in relation of the pharate first instar diapause of the gypsy moth, *Limantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **37**: 197~205.
- Lee, R. E., R. A. Dommel, K. H. Joplin and D. L. Denlinger (1995) Cryobiology of the freeze-tolerant gall fly *Eurosta solidaginis*: overwintering energetics and heat shock proteins. *Climate Res.* **5**: 61~67.
- Moribe, Y., T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma, (2001) Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs. *Eur. J. Biochem.* **268**(12): 3432~42.
- Natori, S., H. Shiraishi, S. Hori and A. Kobayashi (1999) The roles of *Sarcophaga defense* molecules in immunity and metamorphosis. *Dev. Comp. Immun.* **23**: 317~28.
- Niimi, T., O. Yamashita and T. Yaginuma (1993) A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **213**: 1125~31.
- Noguchi, H. and Y. Hayakawa (2001) Dopamine is a key factor for the induction of egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 774~80.
- Pallis, S. R., R. Kothapalli, Q. Feng, T. Ladd and S.C. Perera (2001) Molecular analysis of overwintering diapause. *Insect Timing: circadian Rhythmicity to Seasonality*. Amsterdam: Elsevier. pp. 133~44.
- Palli S. R., T. R. Ladd, A. R. Ricci, M. Primavera and I. N. Mungrue (1998) Synthesis of the same two proteins prior to larval diapause and pupation in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.* **44**: 509~24.
- Rinehart, J. P., R. A. Cikra-Ireland, R. D. Flannagan and D. L. Denlinger (2001) Expression of ecdyson receptor is unaffected by pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, while its dimerization partner, USP, is downregulated. *J. Insect Physiol.* **47**: 915~21.
- Rinehart, J. P., G. D. Yocum and D. L. Denlinger (2000) Developmental upregulation of inducible hsp 70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**: 515~21.
- Scotland, P. and A. Sehgal (2001) Molecular control of *Drosophila* circadian rhythms. *Insect Timing: circadian Rhythmicity to Seasonality*. Amsterdam: Elsevier. pp. 15~30.
- Su, Z-H., M. Ikeda, Y. Sato, K. Imai, M. Isobe and O. Yamashita (1994) Molecular characterization of ovary trehalase of silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. *Biochem. Biophys. Acta* **1218**: 366~74.
- Suzuki, K., T. Minagawa, T. Kumagai, S. Naya, Y. Endo, M. Osanai and E. Kuwano (1990) Control mechanism of diapause of the pharate first instar larva of silkworm, *Antheraea yamamai*. *J. Insect Physiol.* **36**: 855~60.
- Tammariello, S. P. and D. L. Denlinger (1998) G₀/G₁ cell cycle arrest in the brain of *Sarcophaga crassipalpis* during pupal diapause and the expression pattern of the cell cycle regulator, proliferating cell nuclear antigen. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 83~89.
- Tatar, M. and C-M. Yin (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp. Gerontol.* **36**: 723~738.
- Yamashita, O. (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori* structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.* **42**: 669~79.
- Yocum, G. D. (2003) Isolation and characterization of three diapause-associated transcripts from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* **49**: 161-169.
- Yocum, G. D., K. H. Joplin and D. L. Denlinger (1998) Upregulation of a 23kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 677~82.
- Yoder, J. A., D. L. Denlinger, M. W. Dennis and P. E. Kolattukucy (1992) Enhancement of diapausing flesh fly puparia with additional hydrocarbons and evidence for alkane biosynthesis by a decarbonylation mechanism. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**: 237~43.
- Webb, M-LZ. and D. L. Denlinger (1998) GABA and picrotoxin alter expression of a maternal effect that influences pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Entomol.* **23**: 184~91.