

일본흰개미 (*Reticulitermes speratus*)의 Odorant-Binding Proteins(OBPs) 발현 양상*¹

나종범*^{2†} · 김재경*² · 김규혁*³

Expression Patterns of Odorant-Binding Proteins (OBPs) in a Termite (*Reticulitermes speratus*)*¹

Jong-Bum Ra*^{2†} · Jae-Kyung Kim*² · Gyu-Hyeok Kim*³

요 약

본 연구는 국내에 서식하는 일본흰개미(*Reticulitermes speratus*)의 생리적 특성에 관한 기초연구로서 흰개미의 커뮤니케이션 수단인 페로몬을 후각수용기로 이동시키는 odorant-binding proteins (OBPs)의 발현 양상을 조사하기 위해서 수행되었다. 경남 진주에서 채집된 일개미와 병정개미로부터 더듬이와 다리를 각각 떼어낸 후 OBP가 존재하는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 일개미의 경우 OBP-1의 발현은 더듬이와 다리에서 모두 관찰되었으며, OBP-2와 OBP-3의 발현은 오직 더듬이에서만 관찰할 수 있었다. 병정개미의 경우 OBP-1의 발현은 일개미에서와 마찬가지로 더듬이와 다리 모두에서 관찰할 수 있었으나, OBP-2가 관찰되지 않았으며, 일개미의 더듬이에서만 관찰되었던 OBP-3의 발현을 병정개미에서는 더듬이와 다리 모두에서 볼 수 있었다. 일개미와 병정개미에서 OBP 발현 양상의 차이는 그들의 역할에 따른 분화적 특이성에 기인한 것으로 생각된다.

ABSTRACT

This research was performed to investigate the expression patterns of odorant-binding proteins (OBPs) migrating hydrophobic semiochemicals such as pheromone to the olfactory receptors in a termite (*Reticulitermes speratus*). Antennas and legs were cut from soldier and worker termites, respectively, and RT-PCR were conducted to investigate the existence of the OBPs reported up to now. Blast search

*¹ 접수 2004년 7월 22일, 채택 2004년 10월 8일

*² 진주산업대학교 이공대학부 College of Sciences and Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

*³ 고려대학교 생명환경과학대학 College of Life and Environmental Sciences, Korea University, Seoul 136-701, Korea

† 주저자(corresponding author) : 나종범(e-mail: jb@jinju.ac.kr)

suggested that the OBPs obtained were highly homologues of the OBPs reported. In worker termites, OBP-1 was expressed in both antennas and legs, OBP-2 and OBP-3 were observed only in antennas. And in soldier termites, OBP-1 was shown in both antennas and legs, OBP-2 were not observed, and OBP-3 was found in both antennas and legs. The differences of expression patterns of OBPs between worker and soldier termites may be explained by their specialized peculiarity.

Keywords: Termite, odorant-binding proteins (OBPs), RT-PCR, *Reticulitermes speratus*

1. 서 론

흰개미는 개미와 유사하게 생겼지만 벌 목에 속하는 개미와는 달리 흰개미 목으로 분류된다. 약 2억 년 전에 바퀴 목으로부터 갈라져 나온 흰개미는 개미·벌과 같이 집단을 형성하는 사회적 곤충으로 한랭지를 제외한 아열대·열대 지역에 널리 분포하고 있다. 전 세계적으로 2,500종(열대 아프리카에 약 500여 종이 분포함)의 흰개미가 존재하지만, 서식처와 먹이에 따라서 일반적으로 drywood, dampwood, harvester, 및 subterranean의 네 종류로 나눈다. 온대에 사는 것은 지하에 사는 것이 많고, 또 죽은 나무, 자른 그루터기나 재목 속에 살며, 목조건물에 큰 해를 가하는 경우도 있다.

주로 땅 속에서 생활을 하기 때문에 눈이 거의 퇴화되어 있는 흰개미는 대부분의 다른 곤충들처럼 페로몬과 같은 분자규모의 작은 물질을 이용하여 외부환경에 대한 정보를 얻으며, 또한 개체 상호간에 화학적인 커뮤니케이션을 행한다. 이러한 화학물질들은 매우 큰 소수성을 지니고 있어 물에 잘 용해되지 않기 때문에 대부분의 곤충들은 이들을 액상상태로 신호전달(signal transduction)이 시작되는 후각수용기(olfactory receptor)로 운반하기 위해서 특정 단백질을 사용한다. 이들 화학물질을 운반하는 단백질은 6개의 시스테인기를 가지고 있는 odorant-binding protein (OBP)과 4개의 시스테인기에 의해 형성되는 chemosensory protein (CSP)의 두 가지로 구분할 수 있는데, OBP는 나비 목(Lepidoptera), 딱정벌레 목(Coleoptera), 파리 목(Diptera), 벌 목(Hymenoptera) 및 노린재 목(Hemiptera)에서 발견되며, CSP는 진화가 덜 된 메뚜기 목(Orthoptera)과 대벌레 목(Phasmatodea) 등에서 발견된다고 보고된 바 있다

(Marchese *et al.*, 2000).

흰개미의 OBP에 관한 연구는 최근에 와서야 Isida 등(2002)에 의해 수행되었다. Isida 등(2002)은 dampwood 흰개미(*Zootermopsis nevadensis*)의 더듬이로부터 세 종류의 OBP를 분리하였으며 이들이 풍덩이와 나방에서 발견되는 OBP와 매우 유사하다고 보고한 바 있다. 그러나 국내의 경우를 살펴보면 흰개미에 대한 연구는 종류 및 분포 그리고 방제법에 대한 연구가 일부 수행되었을 뿐이며 아직까지 페로몬이나 OBP와 같은 흰개미의 생리적 특성에 관한 연구는 거의 수행되지 않았다. 커뮤니케이션에 중요한 역할을 담당하는 OBP와 같은 생리적 특성에 대한 연구는 효율적인 흰개미 방제법을 구축할 수 있는 기초 자료로서 활용될 수 있다는 점에서 중요하다고 할 수 있다. 본 연구는 국내에 광범위하게 서식하는 subterranean 흰개미의 일종인 일본흰개미(*Reticulitermes speratus*)의 목재 가해 특성을 조사하기 위한 기초연구로서 일본흰개미의 OBP 발현 양상을 조사하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

경남 진주에 위치한 진주산업대학교내 소나무 그루터기에서 일본흰개미(*Reticulitermes speratus*) 군체를 채집한 후 플라스틱 통에 넣어 한 달 동안 상온에서 보관하였다. 채집된 군체로부터 일개미와 병정개미 각각 150마리씩 얼음을 사용하여 순간적으로 기절시킨 후 더듬이와 다리를 각각 분리하였다. 분리된 더듬이와 다리를 TRIzol (Invitrogen) 용액에 넣고 막대사발을 이용하여 곱게 갈은 후 클로로포름(TRIzol 1 ml 당 200 μ l)을 넣고 원심분리하였다. 원심분리된 용액의 상층액으로부터 이소프로판올(TRIzol 1 ml 당

500 μ l)을 이용하여 RNA를 침전시켰으며, 침전된 RNA는 70% 에탄올로 세척한 후 실온에서 건조한 뒤 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수로 용해하였다. 분리한 RNA에 oligo-dT, RT, dNTP를 넣은 후 42°C에서 한시간 동안 cDNA를 합성하였다.

Dampwood 흰개미에서 발견한 세 종류의 OBP가 국내에 서식하는 subterranean 흰개미의 일종인 일본흰개미에도 존재하는지의 여부를 확인하기 위해 Ishida 등(2002)이 제시한 염기 서열에 따라 프라이머를 합성하였으며 대조구로서 actin이 사용되었다. 이들의 염기서열은 아래와 같다.

OBP-1:

5'GTGTCATGGTTCGAACATCATGGCTCTCAACG3'
5'CGATGGCCCTCTTCCACGATCTCTGGCGGT3'

OBP-2:

5'CTCAACATGACTGGCAGTTTCCCCGATGAG3'
5'CCGAACGCCTCCTTCAACTTAGCGGCGACC3'

OBP-3:

5'GGAACCCCTTGCAGCTTCTCCACCACTGTC3'
5'ACTTCGGCAGTTTCCCCCATGAGTCCGACC3'

Actin-1:

5'AA(C/T)TGGGA(C/T)GA(C/T)ATGGA(A/G)AA3'
5'GCCAT(C/T)TC(C/T)TG(C/T)TC(A/G)AA(A/G)TC3'

OBP 유전자의 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C에서 5초 동안 변성(denaturation) 반응을 실시하고, 55°C에서 10초 동안 결합(annealing) 반응을 실시한 후 72°C에서 확장(extension) 반응을 3분 동안 실시하였다. actin-1 유전자를 증폭하기 위한 조건은 94°C에서 변성반응 1분, 45°C에서 결합반응 2분, 그리고 72°C에서 확장반응 3분이었다. PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색한 후 UV로 확인하였다.

PCR로 증폭된 유전자가 OBP임을 확인하기 위해 전기영동 한 겔로부터 DNA 밴드를 잘라내어 gel extraction kit (QIAGEN)를 이용하여 PCR 산물을 분리하였다. 이렇게 분리된 DNA를 TA cloning kit (Invitrogen)를 이용하여 cloning vector인 PCR 2.1 vector에서 라이게이션(ligation)을 실시하였는데, 라

이게이션 반응은 2 μ l PCR 2.1 vector, 1 μ l DNA ligase, 그리고 겔에서 분리한 PCR 산물을 섞어 14°C에서 10시간 동안 실시하였다.

형질 전환은 열충격(heat shock) 방법을 이용하여 실행하였다. 라이게이션 반응 산물인 라이게이트(ligate)와 반응능세포(competent cell)로서 *E. coli* 세포(DH5 α cell)를 섞은 뒤 얼음 위에서 30분간 정지시킨 후, 42°C에서 30초간 반응시켰다. 반응 후, SOC 배지를 250 μ l 넣고 37°C에서 225 rpm으로 1시간 배양한 뒤 ampicillin과 Xgal, 그리고 IPTG가 들어있는 LB 배지에 평판배양을 실시하였다. 형질전환된 세포들 중에서 PCR 산물을 가지고 있는 세포들을 ampicillin이 들어있는 액상 LB배지에서 키워 DNA를 분리하였으며, 분리한 DNA에 PCR 산물이 삽입되어 있는지를 확인하기 위해서 클로닝 벡터에 있는 제한효소 중 하나인 EcoR I으로 37°C에서 두 시간 배양한 후 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하였다. PCR 산물이 들어있는 것을 확인한 뒤, 이것이 OBP 인지를 확인하기 위해 (주)바이오넥스에 염기서열 분석을 의뢰하였으며, 그 결과는 Blast Search를 통해 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

평판배양 후 형성된 세포들 중 PCR 산물을 가지고 있는 세포들로부터 DNA를 분리한 후 이 세포들이 OBP를 가지고 있는 지를 확인하기 위해 염기서열 분석을 실시한 결과는 아래와 같다.

OBP-1: GTGTCATGGTTCGAACATCATGGCTCTCA
ACGATGAAGGAGACTTCAACGTTGAT
GAAGAACTGCAGAACGTACCGCCAGA
GATCGTGGAAGAGGGCCATCG

OBP-2: CTCAACATGACTGGCAGTTTCCCCGAT
GAGAACGTTAGATCAGCCAAGTGT
CATCCGCTGTATGTTTATGGAAACCG
GAGTGATGGACTCTGATGGAAAGTTG
GTCGCCGCTAAGTTGAAGGAGGCGTT
CGG

OBP-3: ACTTCGGCAGTTTCCCCGGATGAGTCCG

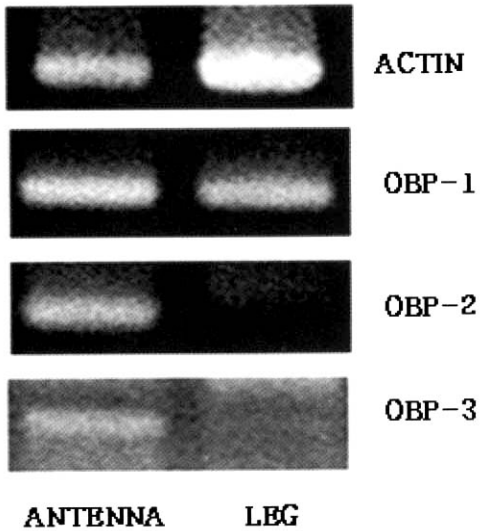


Fig. 1. Expression patterns of OBPs in a worker termite of *Reticulitermes speratus*.

```

ACCAAACCTCCATGTGCTTCATTCATT
GTGTCATGGATAAAAACAGGAATGATG
GACACAGAGGGTACGTTTCATAAAAAA
GACAGTGGTGGAGAAGCTGCAAGGGT
TTCC
    
```

프라이머로 *Zootermopsis nevadensis*에 존재하는 OBP-1, -2, 그리고 -3를 사용하였을 때 *Reticulitermes speratus*에서 분리된 PCR 산물의 크기는 *Zootermopsis nevadensis*에서와 마찬가지로 각각 100 bp, 134 bp, 136 bp이었으며, 이들의 염기서열은 *Zootermopsis nevadensis*의 OBP들과 90% 이상 일치한 것으로 나타났다.

*Reticulitermes speratus*에서의 OBP의 발현 양상을 알아보기 위하여 OBP-1, -2, 그리고 -3에 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 일개미의 더듬이와 다리에서 관찰된 OBP 발현 양상은 Fig. 1에서 볼 수 있는데, OBP-1은 더듬이와 다리에서 모두 발현되었으며, OBP-2와 OBP-3의 경우 더듬이에서만 발현되는 것으로 관찰되었다. 이는 OBP의 발현을 관찰한 Ishida 등(2002)의 결과와 상반된 결과를 보여주는데, Ishida 등은 dampwood 흰개미

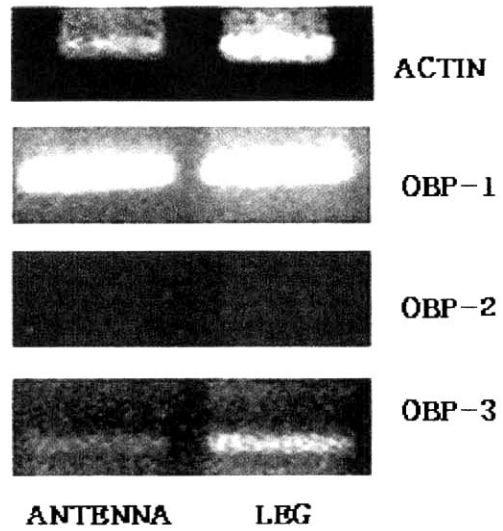


Fig. 2. Expression patterns of OBPs in a soldier termite of *Reticulitermes speratus*.

(*Zootermopsis nevadensis*)에서는 OBP-1, -2, -3 모두 더듬이에서 그 발현을 관찰할 수 있었으며, 다리에서는 그 발현이 관찰되지 않음을 보고한 바 있다. 이러한 결과는 *Zootermopsis nevadensis*와 *Reticulitermes speratus* 간의 생리학적인 차이를 보여주는 데 아마도 생활 서식지의 차이에 따른 진화의 결과로서 추정해 볼 수도 있을 것 같다.

다른 곤충류의 경우를 살펴보면 다리 혹은 날개에서 OBP의 발현이 종종 보고되었는데, 대벌레 목에 속하는 *Carausius morosus*의 다리와 더듬이에서 OBP가 분리됨이 보고되었으며(Tuccini *et al.*, 1996), 꿀벌(*Apis mellifera* L.)에서는 25 종류의 OBP가 다리와 더듬이에 모두 존재하며 이 중 5개는 다리에서는 발현되지 않는 5종류의 OBP단백질이 보고된 바 있다(Danty *et al.*, 1998). 또한 말벌과(Hymenoptera: Vespidae)에 속하는 *Polistes dominulus*에서는 OBP들이 더듬이, 다리 그리고 날개에 모두 발현됨이 관찰되었으며(Cavello *et al.*, 2003), 모기(*Culex quinquefasciatus*)에서는 암컷의 더듬이에서만 특이적으로 발현되는 OBP의 존재가 밝혀졌다(Ishida *et al.*, 2002).

병정개미에서의 OBP 발현양상은 Fig. 2에서 볼 수

있다. OPB-1의 발현은 일개미에서와 마찬가지로 더듬이와 다리 모두에서 관찰할 수 있었다. 그러나 일개미에서는 관찰할 수 있던 OPB-2가 관찰되지 않은 것으로 보아, 이 OPB-2는 일개미에 특이적으로 발현되는 단백질일 것으로 생각되어진다. OPB-3의 경우를 살펴보면, 일개미에서는 그 발현을 더듬이에서만 볼 수 있었던 반면 병정개미에서는 더듬이와 다리 모두에서 그 발현을 관찰할 수 있었다.

이 실험 결과로 미루어 보아 dampwood 일개미의 다리에서는 볼 수 없었던 OPB-1의 발현을 subterranean 일개미에서 관찰할 수 있는 것은 아마도 이들이 환경에 쉽게 적응하고 대처하기 위한 진화적 발전이 아닐까 고려되어진다. OPB-2의 발현이 일개미에서만 관찰되는 것으로 보아, OPB-2는 병정개미에게 보다 일개미에서 그들이 집단 내에서 역할을 수행하는데 더 중요한 역할을 하리라 생각되어진다. 따라서 이 OPB-2는 아마도 일개미의 사회적 역할에 따른 적응의 발로일 것으로 추정된다. 또한 OPB-3의 경우, 일개미에서는 더듬이에서만 그 발현이 한정된 반면, 병정개미에서는 더듬이와 다리 둘 다에서 그 발현이 관찰되는 것으로 보아 병정개미의 역할 수행에 OPB-3가 중요하게 작용하는 것이라고 생각되어진다.

지금까지 연구되어진 곤충의 OBP에 관한 연구에서는 집단 내 역할에 따른 서로 다른 OBP의 발현양상이 제시된 연구가 그다지 많이 수행되지 않았다. 그러나 꿀벌(*Apis mellifera*, L)에서 일벌, 여왕벌의 더듬이에 각각 특이적인 단백질이 분포하며, 이 특이적인 단백질에 의해 계급 또는 성별에 특이적인 후각작용(actory processing)이 존재함을 보고한 Kamikouch 등(2004)의 연구결과를 고려할 때 OBP 유전자의 발현은 곤충 집단의 사회적 계급과 상당한 연관을 가지고 있다고 하겠다.

본 실험은 subterranean 흰개미(*Reticulitermes speratus*)에서 OBP 유전자의 발현을 최초로 입증하고, 흰개미 집단 내에서의 사회적 위치 또는 역할에 따른 상이한 OBP 유전자의 발현을 제시했다는 점에서 그 가치를 들 수 있으며, 이에 대한 보다 심도 깊은 연구를 통하여 각각의 OBP 유전자의 기능과 역할을 밝혀냄이 앞으로 중요한 과제라 하겠다.

4. 결 론

국내에 서식하는 일본 흰개미(*Reticulitermes speratus*)의 목재 가해 특성을 조사하기 위한 기초연구로서 흰개미의 OBP 발현양상이 조사되었다. 일개미의 경우 OPB-1의 발현은 더듬이와 다리에서 모두 관찰되었으며, OPB-2와 OPB-3의 발현은 오직 더듬이에서만 관찰할 수 있었다. 병정개미의 경우 OPB-1의 발현은 일개미에서와 마찬가지로 더듬이와 다리 모두에서 관찰할 수 있었으나, OPB-2가 관찰되지 않았으며, 일개미의 더듬이에서만 관찰되었던 OPB-3의 발현을 병정개미에서는 더듬이와 다리 모두에서 볼 수 있었다. 이러한 차이는 OBP의 역할에 따른 분화적 특이성에 기인한 것이라고 고려되어진다.

참 고 문 헌

1. Cavello, M, N. Guerra, A. Brandazza, C. D'Ambrosio, A. Scalon, F. R. Dani, S. Turillazzi, and P. Pelosi. 2003. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Pollistes dominulus*. Cell Mol. Life Sci. 60(9): 1933~43.
2. Danty, E., G. Arnold, J. C. Huet, D. Huet, C. Mason, and J. C. Pernollet. 1998. Separation, characterization and sexual heterogeneity of multiple putative odorant-binding proteins in the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea). Chem. Senses. 23(1): 83~91.
3. Ishida, Y., V. P. Chiang, M. I. Haverty, and W. S. Leal. 2002. Odorant-binding proteins from a primitive termite. Journal of Chemical Ecology. Vol. 28(9): 1887~1893.
4. Ishida, Y. A. J. Cornel, and W. S. Leal. 2002. Identification and cloning of a female antenna-specific odorant-binding protein in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. J. Chem Ecol. 28(4): 867~71.
5. Kamikouch, A., M. Morioka, and T. Kubo. 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex- and/or caste selective manner. Zoolog Sci. 21(1): 53~62.
6. Marchese, S., S. Angeli, A. Andolfo, A. Scalon, A. Brandazza, M. Mazza, J. F. Picimbon, W. S. Leal,

and P. Pelosi. 2000. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1091~1098.

7. Tuccini, A, R. Malda, P. Rovero, M. Mazza, and P. Pelosi. 1996. Putative odorant-binding protein in antennae and legs of *Carausius morosus* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochem Mol. Biol.* 26 (1): 19~24.