

유충 *Manduca sexta* 리포포린에 의한 지방체로의 디아실글리세리드 운반

윤화경^{1*}

¹한서대학교 생명과학과

The transfer of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*

Hwa Kyung Yun^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Hanseo University

요 약 본 논문은 리포포린에 의해 디아실글리세리드(DAG)가 *Manduca sexta* 유충 지방체로 운반되는 과정을 조사하였다. [³H]-DAG 표지 리포포린([³H]-DAG-Lp)을 시간별로 유충 지방체와 배양하여 지방체로 운반되는 DAG의 방사능을 결정하였다. [³H]-DAG-Lp와 지방체를 배양하면 지방체에 DAG가 축적되며 이의 일부는 지방체에서 트리아실글리세리드(TAG)로 전환되는 것을 알 수 있었다. Suramin과 표지되지 않은 리포포린(unlabeled Lp)의 존재 하에서는 지방체로 운반되는 DAG가 억제되는 데, 이는 DAG를 운반하는 데 리포포린 수용체가 관여한다는 사실을 알 수 있었다. Suramin의 효과는 다소 복잡하지만 리포포린 수용체에 결합하여 막의 특성을 변화시켜 DAG 운반속도에 영향을 주는 것 같다. 지질 운반과정이 수용체-매개 내포작용이라는 사실을 조사하기 위하여 내포작용 억제자인 ammonium chloride와 chloroquine을 처리하였다. 그 결과 리포포린과 지방체사이에서의 지질 운반 기작이 수용체-매개 과정이라는 사실을 보여준다.

Abstract This paper was to characterize the transfer of diacylglycerol(DAG) from lipophorin to *Manduca sexta* larval fat bodies. [³H]-DAG-labeled Lp([³H]-DAG-Lp) was incubated with the larval fat bodies under different times and the time of DAG transfer was determined. Incubation of fat bodies with [³H]-DAG-Lp resulted in accumulation of DAG and TAG in the tissue. The transfer of [³H]-DAG was inhibited in the presence of suramin and unlabeled lipophorin, which would be consistent with a lipophorin receptor. The effects of suramin may be complex because it can change membrane properties when bound to the lipophorin receptor and affect the rate of DAG transfer. To investigate the lipid uptake via receptor-mediated endocytosis, we treated with endocytosis inhibitors, ammonium chloride and chloroquine. The results show that the transfer process of lipid by lipophorin and fat bodies is receptor-mediated endocytosis.

Key Words : Lipophorin, Fat bodies, Endocytosis, Diacylglycerol

1. 서론

곤충의 리포포린은 주요 에너지인 지질을 중장에서 저장장소인 지방체로 운반하여 축적하며, 또한 지질 필요시 지방체로부터 주요 지질 이용기관인 난소 및 정소로 운반하는 역할을 하는 혈액 단백질이다 [1]. 리포포린이 운반하는 주요지질로는 디아실글리세리드 (DAG), 탄화수

소, 인지질과 콜레스테롤등이 있다 [2-3]. 또한, 지질운반인자(lipid transfer particle, LTP)는 유충 중장에서 리포포린으로 DAG의 운반을 용이하게 하고, 리포포린은 DAG를 지방체로 운반하여 트리아실글리세리드(TAG)의 형태로 저장된다 [4]. 리포포린은 지질 뿐만 아니라 단백질 자체도 난자형성에 필요한 에너지를 공급하기 위하여 난소로 흡수된다. 난소에 존재하는 대부분의 단백질은 지방체

본 논문은 한서대학교 2010년도 교내연구비(101 이학 104)에 의해 지원되었음.

*교신저자 : 윤화경(kyung813@hanseo.ac.kr)

접수일 11년 02월 24일

수정일 (1차 11년 03월 23일, 2차 11년 03월 29일)

게재확정일 11년 04월 07일

에서 합성되어 난소로 흡수되며, 흡수되는 과정은 수용체-매개 내포작용으로 일어난다는 사실이 보고 되어 있다. 또한 일부 소량의 단백질은 난소자체에서 합성하기도 한다 [5-7]. 여러 곤충의 지방체와 난소에서 리포포린 수용체가 각 기관의 세포막에 존재하고 있음이 밝혀져 있다 [8-10]. 그러나, 리포포린이 디아실글리세리드를 중장에서 받아 지방체로 운반하여 주는 구체적인 기작은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 [³H]-DAG-Lp를 *Manduca sexta* 유충의 혈액에서 분리 정제하고 이를 지방체와 배양하여 [³H]-DAG가 지방체로 운반되는 과정을 조사하였다. 또한, 운반과정에 필요한 단백질인 리포포린 수용체의 존재여부를 확인하고 리포포린 수용체를 통한 운반기작을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 곤충

*M. sexta*는 전에 언급한 실험과 동일하게 배양하였으며 [11], 본 실험에는 종령 유충을 사용하였다.

2.2 [³H]-DAG-Lp의 분리 및 정제

종령 유충에 [³H]-oleic acid (5Ci/ animal)를 뿌린 인공 사료를 먹였다. 1시간 후에 ice-cold bleeding solution (30 mM KH₂PO₄, pH 6.5, containing 2 mM Na₂EDTA, 10 mM glutathione, and 3 mM NaN₃)에서 핀셋을 이용하여 유충 앞다리로부터 혈림프를 추출하였다. 추출한 혈림프는 12,000 g (4°C)에서 5분 동안 혈구를 제거하기 위해 원심분리 하였다. 원심분리한 혈림프를 KBr 구배 초원심분리를 행하여 이전에 행하였던 실험과 동일하게 [³H]-DAG-Lp를 분리, 정제하였다 [11]. 분리, 정제된 [³H]-DAG-Lp (density of 1.14 g/ml)를 lepidopteran saline (5 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl, 4 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, and 2 mM CaCl₂, pH 6.5)으로 24시간 투석한 후 모든 실험의 시료로 사용하였다.

2.3 [³H]-DAG-Lp와 유충 지방체 배양

Manduca sexta 종령 유충 지방체를 ice-cold lepidopteran saline에서 추출한 후 배양액 (lepidopteran saline - Grace's insect medium in a 1:1 ratio)이 있는 24-well culture plate에 옮겼다. 5분 후에 각각의 지방체를 [³H]-DAG-Lp (1.5 mg/ml; specific activity of 5.5x10⁵ dpm/mg Lp)가 포함되어 있는 새로운 배양액 1.5 ml로 옮겼다. 배양은 상온에서 가볍게 흔들면서 진행하였다. 2시

간 후에 지방체를 제거하여 새로운 배양액 1.5 ml로 15분씩 2번 세척하였다.

각각의 지방체를 균질화한 후 Folch방법 [12]으로 지질을 추출하였다. 지질 분석은 박막 크로마토그래피 (TLC)를 이용하며 해당되는 지질을 긁어서 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능을 측정하였다 [13].

2.4 DAG 운반에 있어서의 suramin과 수용체-매개 내포작용 억제자 효과 측정

지방체 세포막에 있는 리포포린 수용체가 DAG 운반에 관여하는 지를 확인하기 위하여 리포포린 수용체에 결합하여 억제 효과를 나타내는 suramin을 사용하였다. 5 mM suramin과 유충 지방체를 30 분간 배양한 후, 동량의 [³H]-DAG-Lp와 unlabeled Lp (1.5 mg/ml)를 배양액에 첨가하여 2시간 배양하였다. 조직 배양이 끝난 지방체를 신선한 배양액으로 15분간 2번 세척하였다. 세척한 지방체를 균질화하여 Folch방법 [12]으로 지질을 추출하였다. 지질 분석은 박막크로마토그래피를 이용하였으며 DAG와 TAG를 긁어서 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능을 측정하였다 [13].

리포포린 수용체-매개 내포작용에 의해서 운반되는 지를 확인하기 위하여 2종류의 내포작용 억제자인 ammonium chloride (NH₄Cl, 10 mM)와 chloroquine (0.1 mM)을 [³H]-DAG-Lp (1.5 mg/ml)와 지방체가 포함되어 있는 배양액에 첨가하였다. 2시간동안 배양한 후 각각의 지방체를 균질화한 다음 Folch방법 [12]으로 지질을 추출하였다. 지질 분석은 박막크로마토그래피를 이용하였으며 DAG와 TAG를 긁어서 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능을 측정하였다 [13].

2.5 단백질과 지질의 농도 결정

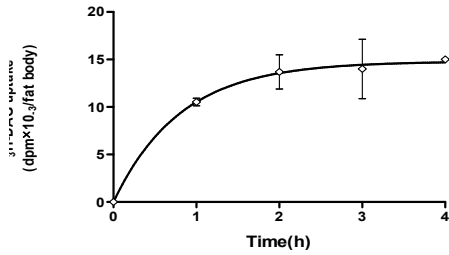
단백질 농도는 표준시료로 Bovine serum albumin을 사용하여 Bradford 방법 [14]으로 측정하였다. 지질추출 및 분석은 Folch방법 [12]을 이용하였으며, 지질분석을 위한 용매로는 hexane - ethylether - formic acid (70:30:3, v/v/v)를 사용하였다.

3. 결과

3.1 [³H]-DAG-Lp에서 유충 지방체로 DAG운반

그림 1은 [³H]-DAG-Lp에서 *Manduca sexta* 유충 지방체로 시간별로 운반된 DAG의 방사능을 나타낸 것이다.

4시간 이상 동안 많은 양의 DAG가 지방체로 운반되었으며, 지방체로 운반된 DAG는 에너지 공급을 위한 지질로 저장된다.



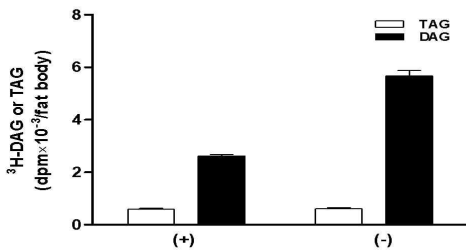
[그림 1] 시간별로 지방체에 흡수된 [³H]-DAG 각 데이터의 방사능은 dpm으로 나타냈으며, 값은 3~4번 실험한 평균값이다.

배양 2시간 후부터는 지방체로 전달되는 DAG가 포화됨으로 지방체로 운반되는 DAG는 단순화산에 의해 운반되는 것이 아니라 지방체 세포막에 존재하는 단백질에 결합하여 운반된다는 것을 확인할 수 있었다.

3.2 DAG 운반에 있어서의 unlabeled Lp의 효과

리포포린 수용체에 리포포린이 경쟁하여 DAG 운반에 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 동량의 [³H]-DAG-Lp와 unlabeled Lp를 유충 지방체와 배양하여 지방체로 운반된 DAG와 지질 저장체인 TAG의 양을 측정하였다.

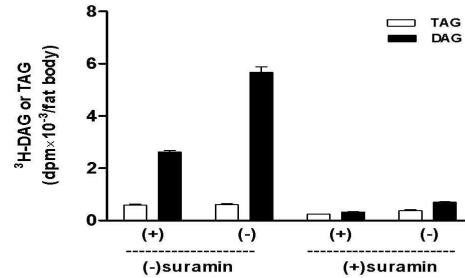
그림 2는 unlabeled Lp를 배양액에 첨가하면, 첨가하지 않은 경우 보다 약 50%정도 지방체에 운반된 DAG의 양이 감소되었으며, 지방체에 저장된 TAG의 양에는 영향이 없었다. 이 사실은 [³H]-DAG-Lp와 unlabeled Lp가 리포포린 수용체에 경쟁적으로 결합하여 DAG 운반에 영향을 준다는 것을 나타낸다.



[그림 2] [³H]-DAG 운반에서의 unlabeled Lp 효과 각 데이터의 방사능은 dpm으로 나타냈으며, 값은 3~4번 실험한 평균값이다. (+); 배양액에 unlabeled Lp의 첨가, (-); 배양액에 unlabeled Lp의 미첨가

3.3 DAG 운반에 있어서의 suramin의 효과

리포포린 수용체 억제자로 알려져 있는 suramin을 이용하여 DAG 운반에 리포포린 수용체의 관여 여부를 확인하였다. 지방체와 5mM suramin을 배양한 다음, 동량의 [³H]-DAG-Lp와 unlabeled Lp를 첨가하여 지방체로 운반된 DAG와 TAG의 방사능을 측정하였다.



[그림 3] [³H]-DAG 운반에서의 suramin 효과 각 데이터의 방사능은 dpm으로 나타냈으며, 값은 3~4 번 실험한 평균값이다. (+); 배양액에 unlabeled Lp 첨가, (-); 배양액에 unlabeled Lp 미첨가

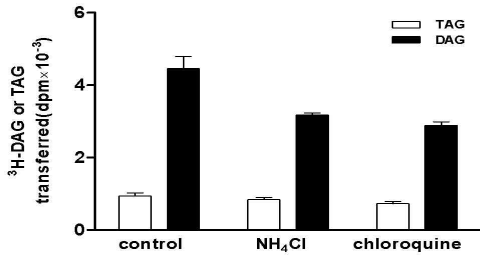
그림 3은 suramin을 배양액에 전 처리한 경우가 전 처리를 하지 않은 경우보다 상당한 양의 DAG가 운반되지 않았음을 보여주며, 지방체에 저장된 TAG의 양도 약간 감소하였음을 알 수 있다. 또한 이 결과는 unlabeled Lp를 처리한 결과와 상당히 일치한다. 그림2와 3의 결과로 리포포린이 유충 지방체로 DAG를 운반하는 경우에는 지방체 세포막에 존재하는 리포포린 수용체가 반드시 필요하다는 사실을 알 수 있다.

3.4 DAG 운반에 있어서의 수용체-매개 내포 작용 억제자 효과

DAG 운반이 지방체 세포막에 있는 리포포린 수용체에 결합하여 수용체-매개 내포작용에 의해서 일어나는 지를 알아보기 위하여 수용체-매개 내포작용 억제자인 NH₄Cl (10 mM)와 chloroquine (0.1 mM)을 [³H]-DAG-Lp(1.5 mg/ml)와 지방체가 포함되어 있는 배양액에 첨가하여 지방체로 운반된 DAG와 저장된 TAG의 방사능을 측정하였다.

그림 4는 리포포린이 지방체로 운반하는 DAG의 양이 대조군에 비하여 NH₄Cl과 chloroquine을 처리하였을 때 상당히 감소되는 사실을 보여준다. NH₄Cl로 처리했을 경우에는 약 35%, chloroquine으로 처리했을 경우는 약 40%정도 지방체로 운반되는 DAG가 감소되었다. 또한 운반된 DAG가 지방체에서 TAG로 전환되어 지방체에

축적되어 있는 TAG의 양도 약간 감소하였다.



[그림 4] [³H]-DAG 운반에서의 NH₄Cl과 chloroquine 효과 각 데이터의 방사능은 dpm으로 나타냈으며, 값은 3~4번 실험한 평균값이다.

4. 고찰

곤충의 주요 혈립프 단백질인 리포포린은 많은 지질을 흡수기관에서 저장 및 이용기관으로 지질을 운반한다. 리포포린은 다양한 종류의 지질을 특정기관에 운반한다 [1]. 특히 리포포린은 DAG의 저장기관인 지방체에서 난소로 운반하여 알 성숙 과정중에 일어나는 난황단백질의 형성에 필요한 물질을 제공한다고 보고되었다 [15]. 리포포린 자체의 내포작용 또한 다양한 곤충에서 일어난다는 사실도 밝혀져 있다 [5,6]. 리포포린이 지방체, 난소 및 정소로 DAG 운반시 리포포린 수용체가 관여한다고 보고되고 있다 [7,8]. 따라서 본 논문은 지방체에 존재하는 리포포린 수용체를 통한 DAG 운반을 확인하였다. 그림 1의 결과로 지방체의 세포막에 리포포린 수용체가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. DAG 저장기관인 지방체에서 리포포린이 DAG 이용기관인 정소나 난소로 운반할 때 리포포린 수용체를 이용한다는 보고가 있는 데 [5], 그림 2에서 unlabeled Lp를 배양액에 첨가하면, 첨가하지 않은 경우 보다 약 50%정도 지방체에 운반된 DAG의 양이 감소됨을 알 수 있었다. 이 결과는 리포포린 수용체에 대해 리포포린이 서로 경쟁을 한다는 사실을 보여주었다. 또한 리포포린 수용체의 억제제 작용하는 suramin을 처리하면 운반된 DAG의 양이 더 감소된다는 사실을 그림 3에서 확인하였다. 이 결과는 지방체로 DAG가 운반되는 과정에 리포포린이 수용체에 리포포린이 결합하는 것이 필수적이라는 사실을 나타낸다. 그림 4는 리포포린 수용체를 이용하여 리포포린이 지방체로 DAG 운반시 수용체-매개 내포작용의 기작을 이용하여 운반되는 지를 확인한 결과이다. 내포작용 억제제인 NH₄Cl과 chloroquine을 처리하면 운반된 DAG양이 상당히 감소하였는데, 내포작

용 억제제에 의해 영향을 받지 않는 콜레스테롤 운반기작과는 다소 상이한 결과를 얻었다 [1,2]. 따라서 위의 실험 결과로부터 *Manduca sexta* 유충 혈립프에 존재하는 리포포린에 의해 유충 지방체로 DAG를 운반하는 과정은 반드시 유충 지방체 세포막에 있는 리포포린 수용체가 필요하며 또한 리포포린이 수용체에 결합하여 수용체-매개 내포작용에 의해서 지방체로 흡수된다는 결론을 얻었다. 위의 사실은 TAG의 형태로 저장되어 있는 지방체에서 에너지가 필요할 때 DAG로 전환된 후, 에너지를 사용하는 기관 즉 난소 [5] 및 정소로 리포포린에 의해 DAG의 형태로 운반되는 과정과 상당히 동일하다는 사실을 알 수 있었다.

참고문헌

- [1] Z.E. Jouni et al., "Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* oocytes in vitro: role of the lipid transfer particle", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33, pp.145 - 153, 2003.
- [2] Z.E. Jouni et al., "Cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body in vitro: high-density lipophorin as the receptor", *J. Insect Physiol.*, 48, pp. 609 - 618, 2002.
- [3] H.K. Yun et al., "Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, pp. 1151 - 1158, 2002.
- [4] L.E. Canavoso et al., "Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*", *J. Lipid. Res.*, 45, pp. 456 - 465, 2002.
- [5] E.S. Jung et al., "Lipophorin uptake by the larval fat body and adult ovary in the wax moth, *Galleria mellonella*", *Entomol. Res.*, 36, pp. 167 - 171, 2006.
- [6] R. Ziegler and R.V. Antwerpen, "Lipid uptake by insect oocytes", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36, pp. 264 - 272, 2006.
- [7] E.S. Jung and H.K. Yun, "Receptor-mediated endocytosis of lipid and lipophorin by the larval fat body, adult ovary and testis in the wax moth *Galleria mellonella*", *Entomol. Res.*, 37, pp. 60 - 65, 2007.
- [8] D. Van Hoof et al., "Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells", *J. Lipid. Res.*, 44, pp. 1431 - 1440, 2003.
- [9] C.S. Lee et al., "Wax moth, *Galleria mellonella*, fat body receptor for high-density lipophorin (HDLp)",

- Arch. of Insect Biochem., 54, pp 14 - 24, 2003a.
- [10]C.S. Lee et al, "Wax moth, *Galleria mellonella*, high-density lipophorin receptor: alternative splicing, tissue-specific expression, and developmental regulation", Insect Biochem. Mol. Biol., 33, pp 761 - 771, 2003b.
- [11]S.V. Prasad et al., "Changes in lipophorin composition during larval-pupal metamorphosis of an insect, *Manduca sexta*", J. Biol. Chem., 261, pp. 558-562, 1986.
- [12]J. Folch et al., "A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues", J. Biol. Chem., 226, pp. 497-509, 1957.
- [13]L.E. Canavoso and M.A. Wells, "Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*", Insect Biochem. Mol. Biol., 30, pp. 1173-1180, 2000.
- [14]M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem., 72, pp. 248-254, 1976.
- [15]윤화경, "꿀벌부채명나방의 성충 난소에 의한 아포리포린-III의 흡수", 한국산학기술학회 논문지, 제10권 제3호, pp. 620-624, 2009.

윤 화 경(Hwakyung Yun)

[정회원]



- 1986년 2월 : 고려대학교 생물학과 (이학사)
- 1991년 8월 : 고려대학교 생물학과 (이학석사)
- 1995년 2월 : 고려대학교 생물학과 (이학박사)
- 1995년 3월 ~ 현재 : 한서대학교 생명과학과 교수

<관심분야>

동물생리 및 지질대사, 곤충생리생화학