

## Methoprene이 매미나방(*Lymantria dispar*) 6령유충의 단백질 함량과 패턴에 미치는 영향

치위생과 오 세 원  
건국대 생물과 강 정 호

### I. 서 론

곤충 혈림프 내의 단백질은 조직의 주요 구성물로서 조직의 성장, 유지에 필요하며 효소 및 호르몬의 주성분으로서 곤충의 성장과 난성숙에 큰 영향을 미치며(de Bianchi and Terra<sup>1)</sup>), 유충의 성장과 변태에 따라 다른 생리물질과 더불어 다양한 농도와 분포 양상을 갖는다. 이러한 혈림프 단백질의 함량과 패턴의 연구로는 Yoo & Lee<sup>2)</sup>, Srivastava *et al.*<sup>3)</sup>, Lee & Shin<sup>4)</sup> 등의 보고가 있다.

곤충 혈림프의 화학적 조성은 내분비계에서 분비되는 호르몬에 의해서 통합, 조절 작용을 받는 것으로 알려져 있는데, 측심체 아래 부위의 아라타체(copora allata: CA)에서 분비되는 유충호르몬은 곤충의 성장과 생식을 조절하여 변태단계에 따른 중요한 내분비적 기능을 수행한다(Gilbert & King<sup>5)</sup>). 그밖에도 유충호르몬은 단백질 합성, 조직성장, 난성숙, 휴면 등에 관여하는 것이 Himeno *et al.*<sup>6)</sup>, Gordon & Burford<sup>7)</sup> 등에 의해 보고되어, 유충호르몬이 혈림프 내 단백질에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

유충호르몬의 기능을 확인하기 위하여 유충호르몬 활성을 지닌 JH 유사물에 의한 효과가 주로 보고되고 있다(Bell<sup>8)</sup>). 이 중 methoprene은 terpene계의 합성 유충호르몬으로서 해충 방제와 유충기 연장을 위한 성장조절제로 사용되고 있으나, 국내에서는 JH(Juvenile Hormone) 유사물 처리에 의한 생리적 조사로는 Shon *et al.*<sup>9)</sup>, Lee & Park<sup>10)</sup> 등이 있을 뿐이다.

따라서 본 실험은 유충호르몬의 기능을 확인하기 위하여 유충호르몬의 유사물인 methoprene을 완전변태를 하는 매미나방(*Lymantria dispar*)의 유충에 처리하여 단백질 함량에 미치는 영향과 패턴을 조사하여 기본적인 생리 수준의 내분비계 작용과 변태 메카니즘의 기초자료를 얻고자 하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험재료

경기도 강화군 일원에서 채집한 매미나방(*Lymantria dispar*)의 난괴를  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , LD 16:8, RH 70% 조건에서 인공사료(wheat germ artificial diet, ICN Biomedical, USA)로 실내 사육하여 건강한 6령 유충을 실험재료로 사용하였다.

유충호르몬 유사물인 methoprene(isopropyl(2E, 4E)-11-methoxy-3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoate)은 경구처리(ingestion treatment)와 도포처리(topical treatment)를 하였는데, 경구처리는 methoprene을 증류수에  $10 \mu\text{l}/100\text{ml}$ 로 희석시킨 용액에 1시간 침적시킨 인공사료 1g씩을 취식시켰으며, 도포처리는 일정농도를 acetone에 희석시켜 microsyringe(Hamilton, USA)로 처리하였다. 농도는  $10\mu\text{l}$ 와  $20\mu\text{l}$  methoprene을 5 $\mu\text{l}$  acetone(2:1, 4:1, v:v)으로 용해시켜 등과 복부에 도포하였고, 대조군은 acetone만을 도포하였다.

### 2. 실험방법

혈림프의 총단백질 함량측정은 Lowry법<sup>11)</sup>을 이용하였는데, bovine serum albumin(4mg/ml)용액을 표준단백질로 하여 1N folin reagent와 반응시켜 그 흡광도로 회귀방정식을 구하여 표준곡선을 작성하고, 시료의 흡광도를 비교하여 함량계산을 하였다. 흡광도는 spectrophotometer(UV-120-02 Shimadzu, Japan)를 이용하여 750nm에서 측정하였다.

단백질 패턴분석은 O'Farrell법<sup>12)</sup>을 수정하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법에 따라 실시하였다. Separating gel 농도가 10%, stacking gel 농도가 4%인 slab gel(16×17×1.5cm)을 사용하였으며, 0.1% SDS가 첨가된 Tris-glycine buffer(pH 8.3)에서 15mA로 12시간 전개시켰다. 시료는 sample buffer와 1:1로 혼합시켜 끓는 물에서 3분간 가열한 20 $\mu\text{l}$ 씩을 각각 사용하였다. 단백질 밴드의 scanning은 electrophoresis scanner(Camag, Swiss)로 K-50 filter를 이용하였다. 각 밴드의 분자량은 표준단백질(Pharmacia electrophoresis calibration kit)을 시료와 동일한 조건으로 전기영동 시켜 표준곡선을 구한 후 시료의 Rf값을 비교하여 분자량을 측정하였다.

### 3. 통계처리

대조군과 methoprene처리군과의 유의성을 검정하기 위하여 1요인 분산분석(One-way ANOVA)과 비모수 검정방법(nonparametric analysis)인 크루스칼-윌리스 검정(Kruskal-Wallis test)과 맨-휘트니 검정(Mann-Whitney test)을 이용하여 분석하였다.

## III. 결 과

Methoprene 처리에 따른 단백질 함량과 패턴 분석은 Table 1 및 Fig. 1, 2와 같다. 총단백질 함량은 대조군과 처리군 모두에서 수컷이 암컷보다 높게 나타났으며( $P < 0.01$ , Table 2), 대조군과 10 $\mu$ l 처리군에서도 암수간의 함량은 뚜렷한 차이를 보였다( $P < 0.05$ , Table 2).

암 수 모두에서 대조군이 도포 처리군 보다는 높은 함량을 보였으나, 경구투입군 보다는 낮게 나타났다(Fig. 1). 한편, 수컷은 대조군 및 처리군간의 유의성 있는 차이를 보이지 못했으나( $P > 0.05$ , Table 3), 암컷은 대조군 및 10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 경구투입 처리군간에 차이를 보여( $P < 0.1$ , Table 3), 암컷이 수컷보다 methoprene의 처리에 영향을 더 받는 것으로 확인되었다.

단백질 패턴은 암수 간에는 저장단백질을 비롯해서 밴드의 차이가 있으며, 대조군과 경구처리군 간에는 처리군에서 억제되어서 나타나지 않는 밴드가 있어 methoprene이 단백질에 선택적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

Table 1. Effects of methoprene on protein contents of the hemolymph in the 6th instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*

Treatment	Protein contents (mg/ml)	
	male	female
Control	461.09 $\pm$ 99.73	284.66 $\pm$ 50.70
10 $\mu$ l	359.84 $\pm$ 16.33	261.18 $\pm$ 31.03
20 $\mu$ l	343.47 $\pm$ 66.48	253.73 $\pm$ 45.55
Ingestion	461.43 $\pm$ 88.38	353.98 $\pm$ 34.44

Treatment : Methoprene dose ( $\mu$ l/larva)

Mean $\pm$ S. D.

Table 2. Mann-Whitney test for effects of methoprene on protein contents of the hemolymph in 6th instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*

Treatment	Sex	Mean	S. D.	U(W)
Total	Male	406.46	85.09	14.5(207.5)**
	Female	288.64	54.57	
Control	Male	461.09	99.73	0.0(15.0)**
	Female	284.66	50.70	
10 $\mu$ l	Male	359.84	16.33	0.0(15.0)**
	Female	261.18	31.03	
20 $\mu$ l	Male	343.47	66.48	1.0(14.0)
	Female	253.73	45.55	
Ingestion	Male	461.43	88.38	1.0(14.0)
	Female	354.99	34.44	

\*\* : P-value < 0.05

Treatment : Methoprene dose ( $\mu$ l/larva)

S. D. : Standard deviation

U(W) : Mann-Whitney U statistics(Wilcoxon W statistics)

Table 3. Kruskal-Wallis test for effects of methoprene on protein contents of the hemolymph in the 6th instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*

Sex	Treatment	Mean	S. D.	$\chi^2$
Male	Control	461.09	99.73	5.8205
	10 $\mu$ l	359.84	16.33	
	20 $\mu$ l	343.47	66.48	
	Ingestion	461.43	88.38	
Female	Control	284.66	50.70	6.8974*
	10 $\mu$ l	261.18	31.03	
	20 $\mu$ l	253.73	45.55	
	Ingestion	354.99	34.44	

\* : P-value < 0.1

Treatment : Methoprene dose ( $\mu$ l/larva)

S. D. : Standard deviation

$\chi^2$  : Chi-square statistics

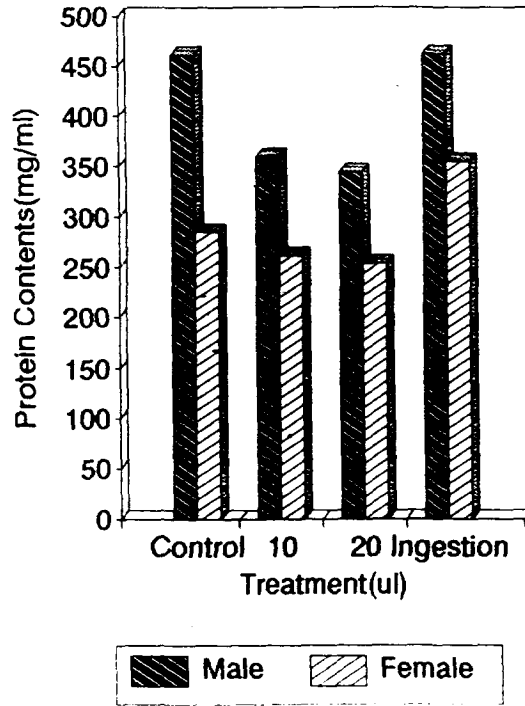


Fig. 1. Comparison of protein contents in order a difference between control and methoprene treatment group of the gypsy moth, *Lymantria dispar*.

#### IV. 고 찰

곤충 혈림프의 화학적 조성은 곤충의 종, 생리적 조건에 영향을 받게 되는데, 혈림프에 의해서 수행되는 물질수송과 대사는 곤충의 성장과 발달에 중요하며 이는 내분비계에 의해 직, 간접적으로 조절 되는 것으로 알려져있다.

곤충의 행동을 통합, 조절하는 내분비계중 유충호르몬(Juvenile Hormone: JH)는 종류에 따라 종과 발생단계에 그 기능의 활성이 다르게 작용한다. 이런 JH의 활성을 지닌 유사화합물인 methoprene 등의 juvenoid는 해충 방제와 유충기 연장을 위한 성장 조절제로 사용되고 있다.

그 밖에도 이들의 효과로는 형태형성 저지, 난황형성, 표피세포의 암화 억제 등 주요 혈림프 단백질 합성을 조절하는 것으로 보고되어(Gunda & Krishnakumaran<sup>13)</sup> Bosquet et al.<sup>14)</sup>, 혈림프 단백질에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

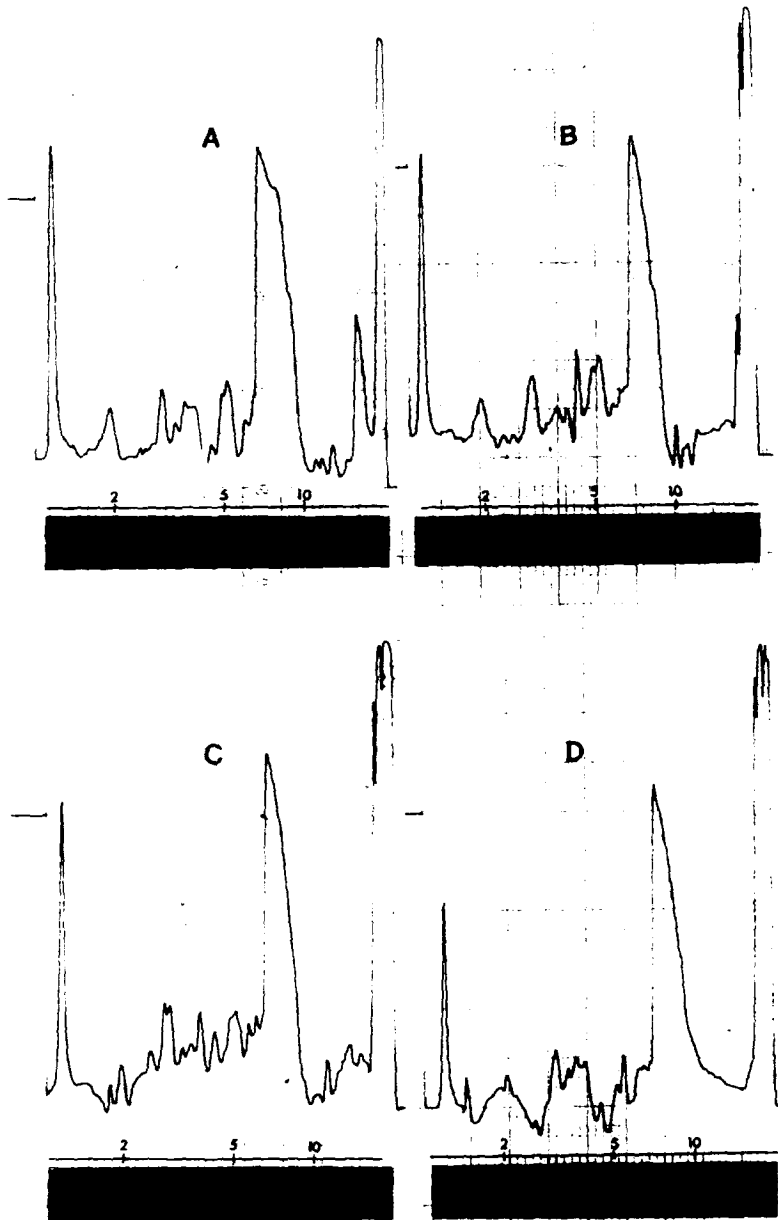


Fig. 2. Densitometric scans of protein bands separated by SDS-PAGE of the 6th instar larva in the gypsy moth, *Lymantria dispar*

- A Control (male)
- B Ingestion treatment (male)
- C Control (female)
- D Ingestion treatment (female)

혈림프의 화학적 조성중 단백질은 곤충의 중요한 내부환경 요인으로 세포와 조직, 효소 및 호르몬을 위한 기본 물질로 그 기능은 다양하다. 매미나방 6령유충에서 methoprene처리에 따른 혈림프 단백질의 양적 변화는 대조군이 도포처리군보다 높은 함량을 보여, *Bombyx mori* 에서 JH처리가 단백질 합성을 저해하였다는 보고(Jones et al.<sup>15)</sup>)와 잘 일치하였다. Gordon & Burford<sup>16)</sup>는 *Aedes aegypti* 유충에서 methoprene이 총단백질 함량을 감소시킨다 하였고, Tojo et al.<sup>17)</sup>은 *Spodoptera litura*에서 유충호르몬이 저장단백질의 합성을 억제한다고 보고하였다. Himeno et al.<sup>18)</sup>은 methoprene이 *Culex molestus* 유충의 단백질 합성과 DNA 및 RNA 함량의 감소를 유도한다고 제시하여 이를 뒷받침 해주고 있다.

수컷보다 암컷이 methoprene 처리 농도에 따른 영향에 유의성 있는 차이를 보였는데, Davis et al.<sup>19)</sup>은 methoprene이 *Lymantria dispar*에서 vitellogenin에 특이적이고 다른 주요 단백질에는 큰 영향이 없는 것으로 보고하였으며, Lindquist<sup>20)</sup>는 methoprene의 효과는 기아나 결찰과는 달리 vitellogenin에 특히 선택적이라 하여 암컷에 영향이 많음을 제시하였다.

de Kort와 Koopmanschap<sup>21)</sup>는 JH 유사물 처리에 의한 *Locusta migratoria*의 단백질 패턴 연구에서 대조군에서는 명확한 저장단백질이 JH 유사물의 처리 농도를 증가시킬 수록 분리가 더욱 어려워지며, 저장단백질 보다 낮은 이동거리에서 새로운 밴드가 확인된다고 보고하여 호르몬 조절이 혈림프 단백질에 선택적으로 작용함을 보여주며, 매미나방에서의 단백질 패턴의 변화가 유충호르몬에 의한 것임을 제시하였다. Jones et al.<sup>22)</sup>은 유충이나 번데기에 JH나 JH 유사물 처리는 다수의 stage-specific 단백질을 저해한다 하여, methoprene이 단백질 합성과정에 영향을 미치는 것으로 보이거나 유전자 발현의 조절 기작에 대한 보고는 아직 없다. 그러나 유충의 혈림프 단백질 합성은 DNA전사에 의한 유전자 조절(Sakai et al.<sup>23)</sup>) 외에도 JH에 의한 영향을 확인할 수 있었다.

반면 경구처리군에서 수컷의 단백질 함량은 유사하였으나 암컷은 증가되었다. 이는 장(gut)의 취식 능력과 연관할 것으로 생각되는데, Bosquet et al.<sup>24)</sup>은 *Bombyx mori* 에서, Carlisle et al.<sup>25)</sup>은 *Locusta migratoria*에서 기아 유충은 먹이 요인이 지방체의 단백질 합성을 자극한다고 보고하였다. Bhaskaran & Jones<sup>26)</sup>는 vitellogenin 등의 단백질 합성과 축적에 대한 기아의 효과는 혈림프내 JH 활성화에 의한다고 하여, 매미나방 유충의 지방체에서의 단백질 합성과 조절은 영양과 호르몬에 의한 것으로 생각된다.

## V. 결 론

유충호르몬(Juvenile Hormone: JH) 유사물인 methoprene(isopropyl(2E, 4E)-11-methoxy-3, 7, 11-trimethyl-2, 4-dodecadienoate)을 매미나방(*Lymantria dispar*)의 6령 유충에 도포처리(topical treatment)와 경구처리(ingestion treatment)를 하여 혈림프 단백질의 함량과 패턴을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총단백질 함량은 도포처리군이 대조군보다 낮은 함량을 보였으나, 경구처리군에서는 증가하였다.
2. 대조군과 Methoprene처리군 모두에서 수컷이 암컷보다 높게 나타났다.
3. 유의수준 10%(P, 0.1)에서, 암컷이 수컷보다 methoprene의 영향을 받는 것으로 나타났다.
4. 단백질 패턴은 methoprene이 대조군과 처리군간에 선택적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

## 참고문헌

1. de. Bianchi, A. G. and W. R. Terra. : *J. Insect Physiol.*, **22**: 535-540, (1976)
2. Yoo, C. M. and K. R. Lee. : *The Korean J. of Entomology*, **4**(2):81-92, (1974).
3. Srivastava, P. N., J. L. Auclair and U. Srivastava.: *Insect Biochem.*, **11**(4):487-489, (1981).
4. Lee, K. R. and B. S. Shin. : *The Korean J. of Entomology*, **18**(2):101- 107, (1988).
5. Gilbert, L. I. and D. S. King. : *In Physiology of Insecta*, 2nd ed., **1**:249-370, (1973).
6. Himeno, M., J. Takahashi and T. Komano. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**:1285-1292, (1979).
7. Gorden, R. and I. R. Burford. : *J. Insect Physiol.*, **30**:279-286, (1984).
8. Bell, W. J. : *J. Insect Physiol.*, **15**: 1279-1290, (1969).
9. Shon, H. D., K. H. Ahn and K. R. Lee. : *The Korean J. of Entomology*, **21**(1) :1-10, (1991).
10. Lee, K. R. and H. S. Park : *J. Basic Sci. Kon Kuk Univ.*, **16**:37-50, (1991).
11. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrugh, A. L. Farr and R. J. Randall. : *J. Biol.*



- Chem.*, **193**:265-275, (1951).
12. O'Farrel, P. H. : *J. Biol. Chem.*, **250**:4007-4021, (1975).
  13. Gunda, R. and A. Krishnakumaran. : *J. Insect Physiol.*, **19**:773-780, (1973).
  14. Bosquet, G., J. Fourche and Guillet. : *J. Insect Physiol.*, **35**(12):1005-1015, (1989).
  15. Jones, G., S. Hiremath, G. Hellman, M. Woznika and R. E. Rhoads. : *In Molecular Entomology*. **49**, (1987).
  16. Gorden, R. and I. R. Burford. : *J. Insect Physiol.*, **30**:279-286, (1984).
  17. Tojo, S., M. Morita, N. Agui and K. Hiruma. : *J. Insect Physiol.*, **31**:283-292.
  18. Himeno, M., J. Takahashi and T. Komano. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**:1285-1292, (1979).
  19. Davis, R. E., T. J. Kelly, E. P. Masler, H. W. Fescemyer, B. S. Thyagaraja and A. B. Borkovec. : *J. Insect Physiol.*, **36**:231-238, (1990).
  20. Lindquist S. : *Ann. Rev. Biochem.*, **55** :1151-1191, (1986).
  21. de Kort, C. A. D. and A. B. Koopmanschap. : *J. Insect Physiol.*, **37**(2):87-93, (1991).
  22. Jones, G., S. Hiremath, G. Hellman, M. Woznika and R. E. Rhoads. : *In Molecular Entomology*. **49**, (1987).
  23. Sakai, N., S. Mori, S. Izumi, K. Naino-Fukushima, T. Ogura, M. Mackawa and S. Tomino. : *Biochem. Biophys. Acta.*, **949**:224-232, (1988).
  24. Bosquet, G., J. Fourche and C. Guillet. : *Insect Biochem.*, **19**:29-39, (1989).
  25. Carlisle J., B. Loughton and E. Ampleford. : *J. Insect Physiol.*, **33**:493-499, (1987).
  26. Bhaskaran G. and G. Jones. : *J. Insect Physiol.*, **26**:431-440, (1981).

Effects of Methoprene on Protein Contents and Patterns of 6th Larval Stages in the Gypsy moth, *Lymantria dispar*

Oh, Se-Won

(Department of Dental Hygiene, Kwangju Heath Junior College.)

Kang, Jeong-Ho

(Department of Biology, Kun Kuk University.)

Abstract

The effects of methoprene, juvenile hormone analogue, protein contents and patterns of 6th larval stages in the gypsy moth, *Lymantria dispar* were studied.

Methoprene has been shown to effects of protein in the hemolymph both topical and ingestion treatment group. Protein contents of the topical treatment group were lower than those of the control group, but ingestion groups were increased. In male, protein concentrations were higher than those on the female. For significance level 10%( $p < 0.1$ ), there exist difference control and methoprene treatment group in female.

Protein patterns make a differences between control and methoprene treatment groups.