

---

碩士學位論文

제주먹초파리 (*Drosophila* sp.) 에서  
호르몬에 의한  
卵黃 蛋白質 合成의 調節

濟州大學校 大學院

生物學科



1991年 12月 日

제주먹초파리 (*Drosophila* sp.) 에서  
호르몬에 의한  
卵黃 蛋白質 合成의 調節

指導教授 吳 文 儒

金 基 玉

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

1991年 12月

金基玉의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

金 源 澤

委 員

金 世 宰

委 員

吳 文 儒

濟州大學校 大學院

1991年 12月

---

Hormonal Regulation of Yolk Protein  
Synthesis in *Drosophila* sp.

Gi-Ok Kim

(Supervised by professor Moon-You Oh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FUFILMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHE JU NATIONAL UNIVERSITY

1991. 12.

# 목 차

ABSTRACT .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
III. 결 과 .....	12
IV. 고 찰 .....	37
V. 적 요 .....	42
VI. References .....	43
감사의 글 .....	51



## ABSTRACT

The yolk proteins are synthesized in both the fat bodies and the ovaries in *Drosophila*. Their syntheses are regulated by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone. The present study was performed to investigate a few chemical characters of yolk proteins and the hormonal regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* species(*robusta species group*) which has been maintained in laboratory from the collection in Cheju Island 1986.

Three yolk proteins, YP-1, YP-2, and YP-3, were isolated from the early stage of embryo, and their molecular weights determined by SDS-PAGE were found to be 48,000, 47,000, and 46,000 daltons, respectively. The isoelectric points (pI's) of the yolk proteins analysed by two-dimensional gel electrophoresis were heterogeneously distributed in the pH range of 5.92 and 6.54.

The yolk proteins became to be firstly detected at 2 days-old female after eclosion, and the average rate of their syntheses in view of the percent of total hemolymph proteins was  $29.5 \pm 8\%$  until 9 days-old female after eclosion. By responding to the treatment of 20-hydroxyecdysone (20-HE) or juvenile hormone(JH III), both fat bodies and ovaries synthesized and secreted the yolk proteins *in vivo* and *in vitro*.

---

The syntheses of yolk proteins in the decapitated female and male were accelerated by administration of 20-HE in a dose-dependent manner. 20-HE activated the yolk protein syntheses not only in the ovaries, but also in the fat bodies of the female. 20-HE also induced the yolk protein syntheses in the male, but it was about 100 times less effective than in the female. JHⅢ also induced the yolk protein syntheses in the female, though its efficacy was lower than that of 20-HE, and the lag time of the induction was longer in the JHⅢ treatment than in the 20-HE treatment. Any yolk protein synthesis was not induced by any dose of JHⅢ in the male. The results suggest that the response of the ovaries to JHⅢ is stronger than that of the fat bodies.



## I. 서 론

난생인 척추동물과 무척추동물들은 배발생 동안 필요한 에너지를 공급하기 위하여 vitellogenesis 과정으로 난황 단백질을 oocyte에 저장한다. 이들 난황 단백질의 합성(vitellogenesis)은 충분한 영양조건이 이루어지면 매우 짧은 기간내에 이루어지며, 이 과정을 거치는 동안 ovary는 발달되고 난황 단백질들은 oocyte에 저장된다.

Vitellogenin 유전자들은 small gene family로 구성된다(Nardelli et al., 1987). Chicken과 *Xenopus laevis*의 vitellogenins 전구체(150-250 KD)는 oocyte 형성과정에서 lipovitellin I (-120 KD), phosphoserine-rich phosphitin(-35 KD), 그리고 lipovitellin II (-30 KD)으로 나누어진다. 선충류인 *Caenorabditis elegans*의 vitellogenin 전구체(180 KD)는 변형이 되거나 분할되어 170 KD, 115 KD 그리고 88 KD vitellogenin으로 구성된다(Nardelli et al., 1987). 메뚜기류, 모기류, 하등쌍시류, 벌 등의 vitellogenin 전구체의 분자량은 180-250 KD인데 분할 또는 변형된 후, 성숙된 vitellin의 분자량은 50-120 KD로 된다(Bownes, 1986; Bonford et al., 1986; Wheeler and Kawooya, 1990). 그러나 이와는 달리 고등 쌍시류(high dipteran)인 초파리의 vitellogenins은 44-50 KD의 매우 작은 분자량을 갖는다(Bownes, 1986).

난황 단백질의 전구체인 vitellogenin 합성은 조직, 발생 단계, 그리고 성에 따른 특이성을 갖고 있으며, 호르몬에 의하여 조절된다(Bownes and Hames, 1977; Bownes and Nothiger 1981; Bownes, 1982, 1989; Hung et al., 1982; Issac et al., 1982; Bownes et al., 1984; Garabedian et

al., 1985; Garabedian et al., 1986; Bownes et al., 1987; Shirras et al., 1987; Nothiger et al., 1989 ). 선충류인 *C. elegans*와 극피동물의 경우 vitellogenin은 장에서 합성되어, hemolymph로 분비된 다음 체강액이나 혈류를 통하여 선택적으로 oocyte로 들어간다((Nardelli et al., 1987; Giorgi et al., 1988; Sharrock et al., 1990). 난생 척추 동물의 vitellogenin은 암컷의 간에서 합성되며 estrogen에 의하여 조절된다(Walter et al., 1981; Nicholas et al., 1991 ). 곤충에서의 vitellogenin은 fat body에서 합성이 되며, ecdysteroid와 juvenile hormone에 의하여 조절된다( Postlewait et al., 1979; Bownes, 1986). *Aedes aegypti*경우는 ovary 자체에서 분비한 ecdysteroids가 fat body를 자극하여 난황 단백질 합성을 조절한다 (Racciopi et al., 1984). 그러나 *Drosophila*의 ovary에서 합성된 ecdysteroids는 oocyte내에 저장되기 때문에 fat body의 vitellogenin 합성에는 아무런 영향이 없다( Postlethwait et al., 1980; Rubenstein et al., 1982; Maroy et al., 1988 ).

*D. melanogaster*의 난황 단백질은 3종류의 polypeptide로 구성되는데, 이들은 분자량에 따라 YP-1(46 KD), YP-2(45 KD) 그리고 YP-3(44 KD)라 명명되었다 (Bownes and Hanes, 1978; Mintzas and Kambysellis, 1982). 이들 3개의 난황 단백질 유전자(*yp-1*, *yp-2*, *yp-3*)는 X염색체 상에 single copy로 존재하며, *yp-1*과 *yp-2*는 약 1 kb 정도로 근접하여 있으나, *yp-3*는 이들로 부터 1000 Kb정도 떨어져 있다 (Barnett et al., 1980; Bownes, 1986; Hung et al., 1982; Garabedian et al., 1987; Yan et al, 1987).

Bownes(1978)와 Postlethwait 등(1979)은 미성숙 *D. melanogaster*에서 분리한 복부에 20-HE와 ZR 515(juvenile 호르몬 유사물질)을 주입하여 난황 단백질의 합성을 유도하였다. *Drosophila* 수컷의 발생 과정에서는 난황 단백질이 합성되지 않지만, 20-HE를 처리하여 난황 단백질의 합성을 유도



할 수 있다(Bownes, 1982; Kozma and Bownes, 1986a, 1986b; Robert et al., 1986; Shirras and Bownes, 1987).

*Drosophila*의 fat body에서 난황 단백질 유전자의 발현은 영양상태, juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone, 그리고 성결정 유전자(*ix*, *dsx*, *tra*, *tra-2*)에 의하여 조절된다(Barnet et al., 1980; Postlethwait et al., 1980; Bownes and Nothiger, 1981; Jowett and Postlethwait, 1981; Bownes, 1982, 1986, 1989; Baker and Belote, 1983; Bownes et al., 1984; Bownes and Blair, 1986; Bouletreau-Merle, 1989). 반면에 ovary에서 난황 단백질 유전자 발현은 juvenile hormone에 의하여 조절이 된다(Postlethwait and Handler, 1979; Gutzeit, 1980; Brennan, et al., 1982; Issac and Bownes, 1982; Schwartz et al., 1985; Nothiger et al., 1989; Bownes and Reid, 1990).

이상과 같이 *D. melanogaster*의 난황 단백질 합성의 조절기작은 진핵생물에서 유전자 발현 조절 기작에 관한 연구의 model system이 되고 있으나, 인접 종에서 이에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 본 연구는 *Drosophila* 아속에 속하는 제주먹초파리(*Drosophila* sp.: *robusta species group*)의 난황 단백질을 분리하여 화학적 특성의 일부를 밝히고, 호르몬에 의한 난황 단백질의 합성 조절 양상을 규명 할 목적으로 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1) 초파리 사육 과 Egg 수집

본 실험에 사용된 제주먹초파리(*Drosophila* sp.: *robusta* group)는 Lewis(1960)의 표준배지(5.0 % dextrose, 2.5 % sucrose, 8.3 % cornmeal, 1.5 % yeast, 0.06 % phosphoric acid, 0.4 % propionic acid 및 0.45% agar)가 들어있는 사육병에서 25-27 °C 와 70-80 %의 습도 그리고 광은 12 hr-light, 12 hr-dark cycle를 유지하여 사육하였다. 배지 표면에는 생효모의 현탁액을 한 두 방울 첨가하였다.

초기배아는 cage에서 대량 사육된 성체로부터 Arking(1976) 방법에 따라 수집하였다. 그리고 실험에 사용된 female은 old pupa를 cage로부터 수거하여 사육병에 옮긴 후 우화되어 나온 성체를 시간과 날짜 별로 준비하였다.



### 2) 난황 단백질 순수분리

수집 된 초기배아는 난막을 제거하여 10배의 균질화 buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 0.25 M NaCl)에서 균질화 시킨 후 4 °C, 12,000 × g에서 30분 동안 원심분리를 하였다. 원심분리 후, 상층액을 50 % 포화된 ammonium sulfate 용액에서 하루동안 투석시킨 후 다시 12,000 × g에서 원심분리하였다. 침전된 단백질은 균질화 buffer에 녹인 후 다시 80 % 포화된 ammonium sulfate에서 하루동안 투석시킨 후에 12,000 × g에서 재 원심분리하였다. 침전된 난황 단백질은 균질화 buffer를 부가하여 녹인 후에

2일 동안 증류수에서 투석시켰다. 최종적으로 원심분리하여 얻은 water insoluble fraction(난황 단백질)은 사용할 때까지 -20 °C에 저장하였다.

### 3) 난황 단백질의 항혈청 준비

난황 단백질의 항혈청은 Bailey(1984)의 방법에 따라 생성하였다. New Zealand White rabbit에 순수 분리된 난황 단백질 1.0 mg과 Freund's complete adjuvant 1.5 ml를 혼합하여 피하 주사하고, 1 주일 후에 난황 단백질 1.0 mg과 Freund's incomplete adjuvant 1.5 ml를 혼합하여 2차 주사를 하였다. 혈청은 2차 주입 후, 2 주일 후에 채취하였다. Double diffusion은 Ouchterlony(1958)방법에 따라 immunodiffusion gel( 1 % agarose, Tris-barbital buffer, pH 8.6)에서 실시하였다. 그리고 humid chamber에서 24시간 동안 diffusion시킨 후에 침강line을 관찰하여 gel세척액(45 % ethanol, 10 % acetic acid)에서 2-3회 세척 후에 gel dry를 하였다. 염색은 0.5 % Coomassie-blue ( 45 % ethanol, 20 % acetic acid)용액에서 20분 동안 염색한 후에 탈색하였다.

### 4) Hemolymph 채취

Hemolymph 채취는 초파리를 마취병에서 dimethyl ether로 마취시킨 후에 해부현미경 하에서 초파리당 10  $\mu$ l의 0.1 M sodium phosphate buffer (0.15 M NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM Glutathione, pH 7.0)에서 조직이 상하지 않게 복부를 해체하여 hemolymph가 buffer에 녹아 나오도록 하였다. 한 group 당 10 마리 female flies를 sample로 사용하였다. 회수된 buffer에 포함된 hemolymph protein은 90 % acetone을 9배 정도 첨가하여 -20 °C에서 침전 시켰다. 침전된 단백질은 12,000  $\times$  g 에서 원심분리하여 수확하였다.

##### 5) 일차원 전기영동 (SDS-PAGE)

Sodium dodecyl sulphate—polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemli(1970)방법을 약간 변형하여 실시하였다. 영하 20 °C에 보관하였던 시료를 진공건조기에서 건조시킨 후 SDS sample buffer(0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 % SDS, 10 % (w/v) glycerol, 0.1 % BPB)를 첨가하여 100°C에서 3분 동안 가열하였다. 단백질은 Lowry et al.(1951)의 방법으로 정량하였다. 단백질은 10 % gel 또는 8-15 % gradient slab gel에서 분리하였다. 표준 분자량 marker(Sigma)로는 bovine albumin(66,000), egg albumin (45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), carbonic anhydrase(29,000), trypsinogen(24,000), 그리고 trypsin inhibitor(21,000) 등을 사용하였다.

*In situ* peptide mapping은 Cleveland et al.(1977)의 방법을 이용하였다. 난황 단백질을 10 % SDS-PAGE로 분리해서 Coomassie blue로 염색한 후, 각각의 band를 10  $\mu$ l의 protease buffer (1.25 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.0)에서 chymotrypsine 0.05  $\mu$ g 또는 0.1  $\mu$ g을 처리하여 15% SDS-PAGE을 수행하였다. 전기영동 후 생성된 proteolytic fragment 양상은 silver 염색으로 관찰하였다.

Autoradiograph는 전기영동 후 겔을 0.5 % Coomassie-blue(45 % methanol, 15 % acetic acid)로 염색하여, 탈색한 다음 겔 건조기에서 겔을 건조시킨 후에 X-ray film (Kodak)과 함께 -70°C에서 15일 동안 노출시켰다. Gels scanning은 흡광도 550 nm에서 microdensitometer을 이용하여 전체 hemolymph에 대한 난황 단백질의 비율(\*)을 측정했다.

#### 6) 이차원 전기영동(two dimensional electrophoresis)

이차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 단백질은 1차로 등전점 전기영동으로 분리하고, 이어 2차로 12.5 % SDS-PAGE 전기영동으로 분리하였다. 등전점 전기영동은 4 % acrylamide, 9.8 M urea, 2 % Nonidet P-40 및 2 % Ampholine(LKB)로 구성된 겔이 들어 있는 15 × 3 mm의 원통 유리관에서 실시하였다. Ampholine은 pH 5-7 과 pH 3-10을 혼합하여 사용하였으며 대략적으로 pH 5에서 7의 pH 분포를 나타내게 하였다. 시료를 apply 하기 전에 prerunning을 시킨 후, 20-30  $\mu$ l의 시료를 겔의 염기성 끝단에 올리고, 10  $\mu$ l의 overlay sol.(9 M urea, 1 % ampholine)을 시료 위에 첨가하여 400 V에서 17시간 동안 전기영동하였다.

난황단백질의 isoelectric point결정은 전기영동이 끝난 IEF gel을 0.5 cm 간격으로 microcombination pH probe(LKB)로 측정하였고, 등전점 전기영동이 끝난 후 겔은 SDS-sample buffer(10 % glycerol, 5 % 2-mercaptoethanol, 2-3 % SDS, 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8)에서 2시간 equilibrium시킨 후에 SDS-PAGE을 실시하였다.

#### 7) Western blotting

SDS-PAGE로 분리된 단백질은 transfer buffer( 14.4 g glycine, 3 g Tris/1 L )에서 nitrocellulose paper로 전기적으로 전이시켰다(Towbon et al., 1979). Nitrocellulose paper는 TBS(50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7.4)buffer에 5 % BSA를 녹인 용액(blocking sol.)에서 3시간 동안 blocking하고, 다시 blocking sol.에 anti-YPs antiserum을 첨가하여 12 시간 반응시킨 후, TNT(TBS buffer, 0.1 % Triton X-100) buffer로 30분씩

4회 세척했다. 다시 세척된 nitrocellulose paper는 anti-IgG conjugated peroxidase를 갖고 있는 second antibody로 2시간 동안 반응시킨 후에 TNT buffer와 TBS buffer로 각각 5회 씩 세척하였다. 난황 단백질의 검출을 위한 염색은 효소기질용액( 16 ml의 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 4 mg. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5  $\mu$ l)에서 30분 간 실시하였다.

#### 8) *in vivo*에서의 hormone 처리

우화 후 2시간 또는 1일된 female를 해부현미경 하에서 나이론 실로 복부와 가슴사이에서 ligation한 후에 흉부를 가위로 제거시켜 복부만 남긴다. 그리고 체내에 hormone 농도를 저하시키기 위해 25°C에서 24시간 동안 humid chamber에 방치하였다.

20-hydroxyecdysone(20-HE)의 처리는 10 % Ethanol에서 10<sup>-2</sup> M로 희석하고, Ringer's용액으로 적절한 호르몬 농도를 맞추어 microdispenser pipette을 이용하여 0.3  $\mu$ l 씩 복부에 주입하였다. Juvenile hormone III (JHIII)는 10<sup>-2</sup> M의 농도로 acetone에 녹인 후 적절한 농도로 맞추어 microdispenser pipette으로 복부에 0.3  $\mu$ l 정도 처리하였다. 20-HE 처리구에는 10 % ethanol을, JHIII 처리구에서는 acetone을 대조구로써 주입하였다. Hemolymph proteins은 <sup>35</sup>S-methionine (Amersham)을 Ringer's용액에 1  $\mu$ Ci/ml 농도로 희석하여 복부 당 0.2  $\mu$ l씩 주입하여 2시간 동안 표지하였다.

#### 9) *in vitro* 에서 hormone 처리

우화 후 1일 된 초파리를 마취시켜 20  $\mu$ l Ringer's 용액에서 복부를 해체하여 body walls과 ovaries를 분리하고, Ringer's 용액에서 2-3회 세척

한 후, 10쌍 씩의 ovary와 body walls를 30  $\mu$ l Ringer's 용액으로 옮겨 배양하였다.

JHⅢ과 20-HE는  $10^{-3}$  M로 처리 한 후 45분 간격으로 2  $\mu$ l  $^{35}$ S-methionine(1  $\mu$ Ci/ml) 를 첨가하여 2시간 배양시킨 후에 배양액에 분비된 단백질을 추출하였다. 단백질은 90 % acetone으로 침전시켜 얻었다.

#### 10) Hormone에 의한 oocytes 발달 효과

우화 후 2일된 female를 마취시킨 후에 JHⅢ, 20-HE 및 JHⅢ-20HE 호르몬을 조합하여 복부에 0.3  $\mu$ l 씩 복부에 처리하여 표준배지에서 6시간 동안 사육 하였다. 사육된 female 복부를 Ringer's 용액에서 해체하여 도립 현미경 하에서 King(1970)의 방법에 따라 각 단계의 vitellogenic oocyte의 수를 조사하였다. 대조구와 처리구 사이의 유의성은 F-test로 검정하였다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1) 난황 단백질 분리 및 정제

난황 단백질은 female의 fat body에서 합성되어 hemolymph로 분비되면 oocyte에서 선택적으로 흡수하므로 hemolymph와 초기 배아에는 많은 양의 난황 단백질을 함유하고 있다(Fig. 1). 따라서 난황 단백질의 neutral low-salt buffer에서 불용성인 성질을 이용하여 초기 배아로부터 난황 단백질을 분리하였다 (Warren et al., 1979).

Crude embryo extract를 10% SDS-PAGE로 분리하면 3종류의 난황 단백질 (YP-1, YP-2, and YP-3)이 검출된다 (Fig. 2, lane 2). Crude embryo extract의 50-80% ammonium sulfate 분획에 3종류의 난황 단백질 모두가 침전되었다 (Fig. 2, lane 3). 다시 50-80% ammonium sulfate분획을 증류수에 투석하여 증류수에 불용성인 난황 단백질을 획득하였다(Fig 2, lane 5). 난황 단백질을 순수 분리하는 단계는 Table 1과 같다. 본 실험에서 얻은 난황 단백질의 수익은 9.2%였고, SDS-PAGE로 결정된 3종류의 난황 단백질의 분자량은 YP-1이 48,000, YP-2가 47,000 그리고 YP-3는 46,000 daltons 이었다.

#### 2) 난황 단백질의 부분적인 화학적 특성

순수 분리한 난황 단백질을 이차원 전기영동으로 분리한 결과 3개의 난황 단백질들의 등전점(pI)은 서로 약간씩의 차이가 있었다. 이들의 pI값은 pH 5.95에서 pH 6.54 까지 범위의 이질적인 분포를 보였다 (Fig. 4).



Chymotrypsin을 사용하여 3종류의 난황 단백질을 *in situ* peptide mapping으로 비교해 본 결과 생성된 peptides 절편 양상이 서로 달랐는데, 이들을 서로 비교할 때 YP-1과 YP-2는 YP-3에 비하여 비슷한 peptides 절편 양상을 가지고 있었다 (Fig. 3).

순수 분리된 3종류의 난황 단백질 혼합물로 생성한 항혈청과 난황 단백질을 double diffusion으로 분석한 결과, 항원을 중심으로 침강선이 관찰되었다 (Fig. 5). 동일한 항혈청을 사용하여 초기 배아와 hemolymph sample에서 SDS-PAGE로 분리한 단백질을 Western blotting 결과 난황 단백질과 분자량이 같은 triplet-bands가 검출되었다 (Fig. 6).

### 3) 암컷의 발생과정 중의 Yolk protein 합성 양상

우화 단계부터 9일까지 암컷의 hemolymph 단백질을  $^{35}\text{S}$ -methionine으로 표지하여 SDS-PAGE로 분리한 후 합성된 난황 단백질과 누적 난황 단백질이 전체 hemolymph 단백질에서 차지하는 비율을 분석하였다 (Fig. 8). 난황 단백질은 우화 후 2일부터 hemolymph에서 추적되기 시작하여 전체 hemolymph 단백질중의 난황 단백질은 최저 12 %에서 최고 40 %까지의 함량으로 검출되었다. 그리고 우화 후 3일부터는 난황 단백질의 합성이 왕성하여 그 합성율은 전체 hemolymph 단백질의  $29.5 \pm 8$  % 정도였다.

### 4) *in vitro*에서 난황 단백질 합성에 미치는 20-hydroxyecdysone(20-HE)과 juvenile hormone III(JH III)처리 효과

20-HE의 농도별에 따른 실험에서는  $10^{-3}$  M 처리구에서만 난황 단백질이 합성되었다(Fig. 9 A, lane 2). 같은 결을 Western blotting으로 분석하면  $10^{-3}$  M과  $10^{-4}$  M 처리구에서 난황 단백질 합성이 검출되었는데,  $10^{-4}$  M에서

는 매우 작은 양의 난황 단백질이 합성되었다(Fig. 9 B, lane 3 and 4). 우화 후 2 시간된 암컷에서는 YP-1만이 합성된 반면에 우화 후 1일된 암컷에서는 YP-1, YP-2 및 YP-3 모두가 합성되었다(Fig. 10, lane 2). 20-HE의 농도별에 따른 YP-1, YP-2 및 YP-3의 합성율(%)을 비교할때 YP-1이 YP-2나 YP-3에 비하여 높았다 (Fig. 11). 그리고 YP-1, YP-3는 hormone 농도가 증가 할수록 합성량이 증가되었으나 YP-2는  $10^{-4}$  M에서 최대의 합성율을 보인 반면에  $10^{-3}$  M에서는 다소 감소하는 경향을 보였다.

JHⅢ( $10^{-3}$ M)와 20-HE( $10^{-3}$  M)을 처리하여 시간에 따른 난황 단백질의 합성 양상을 분석한 결과 YP-1, YP-2 및 YP-3가 모든 실험군에서 합성이 점차 증가되었다. JHⅢ와 20-HE처리구에서 공히 처리 후 4시간까지는 난황 단백질의 합성율이 비슷하였으나, 처리 후 5시간에는 20-HE 처리구에서 가장 높아졌다가 6시간에서는 JHⅢ와 20-HE처리구에서 모두 감소하였다(Fig. 12).

#### 5) *in vitro*에서 난황 단백질 합성에 미치는 20-HE와 JHⅢ처리 효과

우화 후 2시간된 암컷에서 분리한 fat bodies와 ovaries를 배양하면서 JHⅢ와 20-HE를 처리하여 0시간에서 45분 간격으로 360분까지 배양액에 분비된 단백질을 분석하였다. Fat bodies에서의 난황 단백질 합성에 미치는 영향은 20-HE의 효과( $14 \pm 3$  %)가 JHⅢ의 효과( $10 \pm 1$  %)보다 약간 높았다 (Fig. 17). 20-HE 처리구에서는 배양시간이 경과 할 수록 난황단백질의 합성율이 증가되었으나, JHⅢ 처리구에서는 처리 후 315분 후부터 합성율이 점차 감소하였다(Fig. 13).

반면에 ovaries에서는 JHⅢ의 효과( $20 \pm 4$  %)가 20-HE의 효과( $4 \pm 1$  %)에 비해 약 5배 가량 높았다 (Fig. 14, Fig. 16). JHⅢ 처리구에서의 난황 단

백질은 처리 후 180분부터 급격히 합성되기 시작하여 이후 꾸준한 합성이 유지되었지만, 20-HE 처리구에서는 처리 직후부터 360분까지 낮은 합성 양상을 보였다.

우화 후 1일된 암컷의 복부에 JHⅢ, 20-HE 및 JHⅢ-20-HE을  $10^{-3}$  M로 처리하여 fat bodies의 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, fat bodies에서 합성된 전체 단백질 중에 난황 단백질이 합성율은 JHⅢ ( $11 \pm 1$  %), 20-HE( $14 \pm 2$  %) 및 JHⅢ-20-HE( $11 \pm 1$  %)였고, 처리 후 4시간에서 가장 높게 합성되었다 (Fig. 15).

#### 6) Oocytes발달에 미치는 hormone처리 효과

우화 후 3일된 암컷의 복부에 JHⅢ와 JHⅢ-20HE을 각기  $10^{-3}$  M의 농도로 처리하여 6시간 동안 표준배지에서 사육한 후 vitellogenic단계의 oocyte 수를 조사하였다. JHⅢ 처리구에서 ovary당  $44 \pm 13$ 개, 20-HE-JHⅢ 처리구에서  $38 \pm 11$ 개, 그리고 대조구인 acetone 처리구에서  $31 \pm 14$ 개로 JHⅢ 처리구에서 가장 많은 vitellogenic oocytes가 관찰되었다 (Fig. 18).

#### 7) 수컷에서 20-HE 처리에 의한 난황 단백질 합성 유도

우화 후 3일된 수컷의 복부에 20-HE을 여러 농도별( $10^{-2}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$ )로 처리하여 분석한 결과는 Fig. 20에 제시하였다. 난황 단백질의 합성은 20-HE 처리 후 6시간에서부터 12시간까지  $10^{-2}$  M과  $10^{-3}$  M 처리구에서 유도되었다 (Fig. 20 A, lane 2; Fig. 20 B, lane 3, 4).

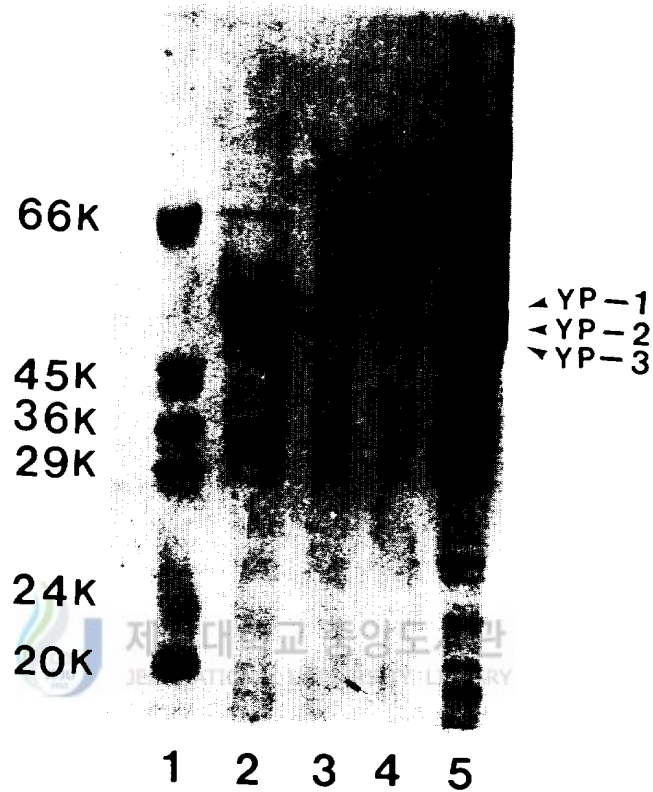


Fig.1. Coomassie blue-stained SDS-polyacrylamide gel of the yolk proteins in embryos and hemolymphs collected from females and males of *Drosophila* sp.(*robusta* group). Lane 1, Molecular weight marker; Lane 2, crude egg extracts.; Lane 3, Female hemolymph; Lane 4, Male hemolymph; Lane 5, Mature embryos of *Drosophila melanogaster*.

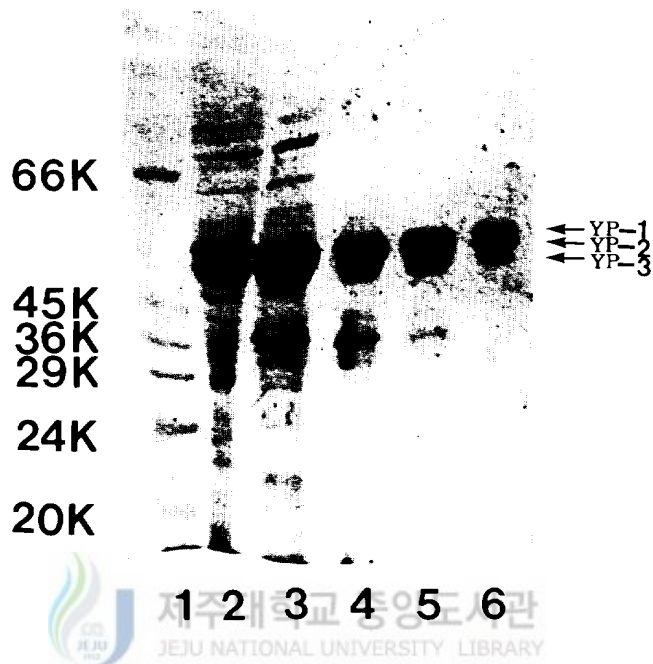


Fig.2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of yolk proteins during purification. Lane 1, Molecular weight markers; Lane 2, 60  $\mu$ g of crude egg extracts; Lane 3, 20  $\mu$ g of 50-80 % ammonium sulfate yolk fraction; Lane 4, 12  $\mu$ g of high-salt insoluble fraction; Lane 5, 12  $\mu$ g of H<sub>2</sub>O insoluble fraction protein; Lane 6, 10  $\mu$ g of final yolk protein preparation.

Table1. Purification of yolk proteins in *Drosophila* SP. (robusta species group).

Fraction	Total protein (mg)	Yield (%)
Crude embryo extract	390	-
50-80% ammonium sulfate fraction	88.4	22.6
H <sub>2</sub> O -insoluble fraction	64.3	16.4
Final yolk protein fraction	30	9.2



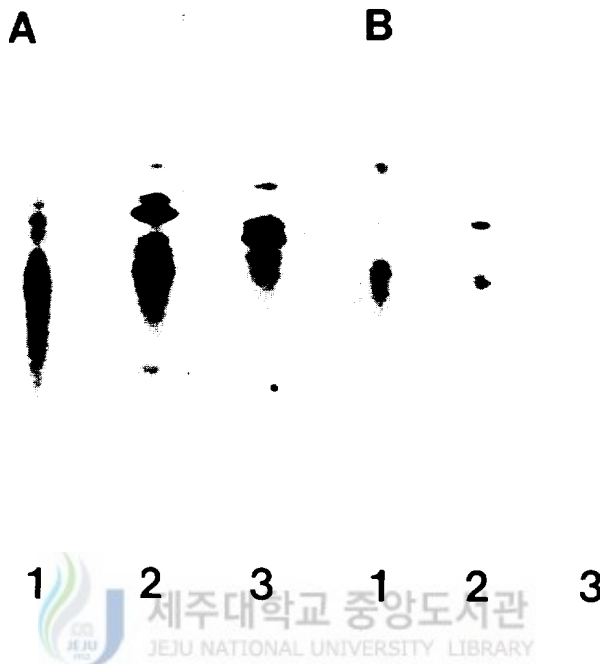


Fig.3. *In site* peptide maps of three yolk proteins. Twenty  $\mu\text{g}$  of the purified yolk proteins were initially run on exponential gradient (8-15 %) PAGE. After staining with coomassie blue, the individual protein bands were cut out and loaded on peptide mapping gel ( 15 % polyacrylamide gel) and subjected to *in site* peptide mapping with (A) 0.05  $\mu\text{l}$  chymotrypsin, and (B) 0.1  $\mu\text{g}$  chymotrypsin. The resulting peptides were then visualized by silver staining. Lanes 1, 2, 3 are YP-1, YP-2, YP-3 polypeptide, respectively.

acidic ← basic

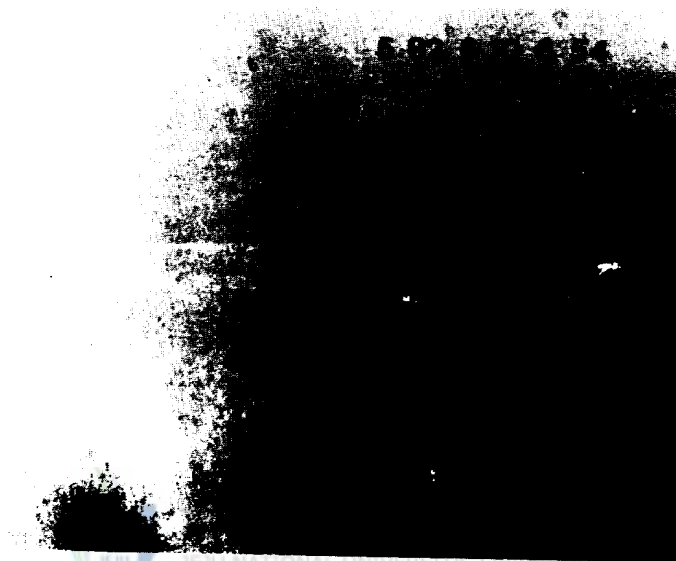
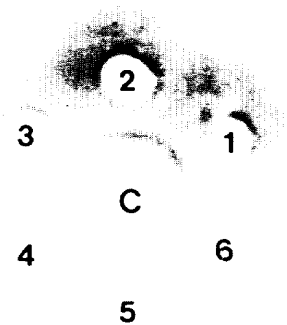



Fig.4. Two-dimensional gel electrophoresis of the purified yolk proteins. In this experiment, the separation of proteins in first dimension was performed by thin layer horizontal isoelectric focusing on a pH gradient about 3 to 10. And then the proteins were separated in 2nd dimension by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, stained with Coomassie brilliant blue.






 제주대학교 중앙도서관  
 Fig.5. Double immunodiffusion of the yolk proteins. C, Purified yolk proteins; 1, full strength antiserum; 2, 1/2 dilution of antiserum; 3, 1/4 dilution of antiserum, 4, 1/8 dilution of antiserum; 5, 1/16 dilution antiserum; 6, 1/32 dilution of antiserum.

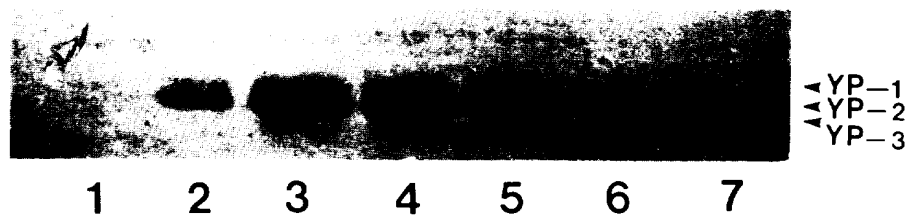


Fig 6. Western blotting of male and female hemolymph proteins. The proteins were separated by the exponential gradient gel(8-15%) SDS-PAGE and reacted with anti-YPs antiserum as described in Materials and Methods. Lane1, 1 day-old female; Lane2, 2 days-old female; Lane3, 3 days-old female; Lane4, 4 days-old female; Lane5, 5days-old female; Lane6, 6 days--old female; Lane7, 3 days-old male.

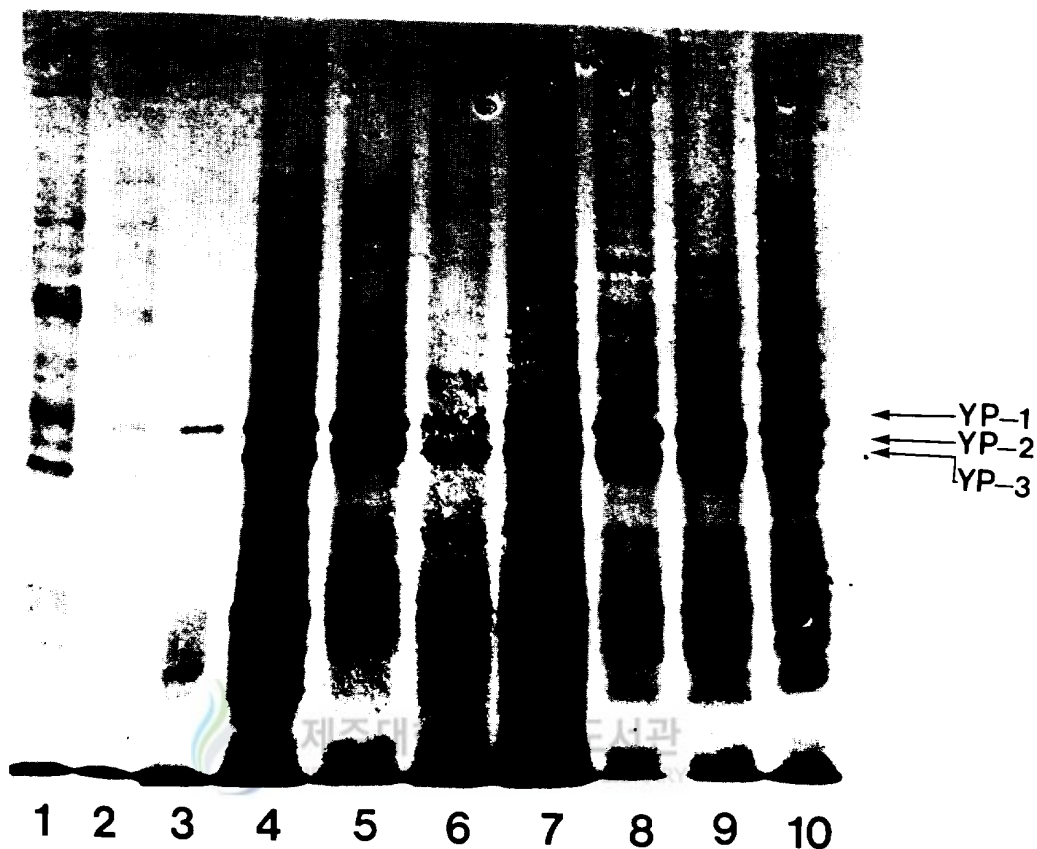


Fig.7. Autoradiograph analysis of the electrophoresed hemolymph from normal development of *Drosophila* sp.(*robusta* group). At various day after eclosion female were labeled by injected  $1 \mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -methionine per abdomen in Ringer sol., after a further 2 hr incubation, and hemolymph was collected with sample buffer and prepared for 10 % SDS-PAGE. And the Coomassie blue stained gels were dried and autoradiographed. Lane 1, 30 min-old; Lane 2, 1 day-old ; Lane 3, 2 days-old ; Lane 4, 3 days-old; Lane 5, 4 days-old; Lane 6, 5 days-old; Lane 7, 6 days-old; Lane 8, 7 days-old ; Lane 9, 8 days-old; Lane 10, 9 days-old female after eclosion.

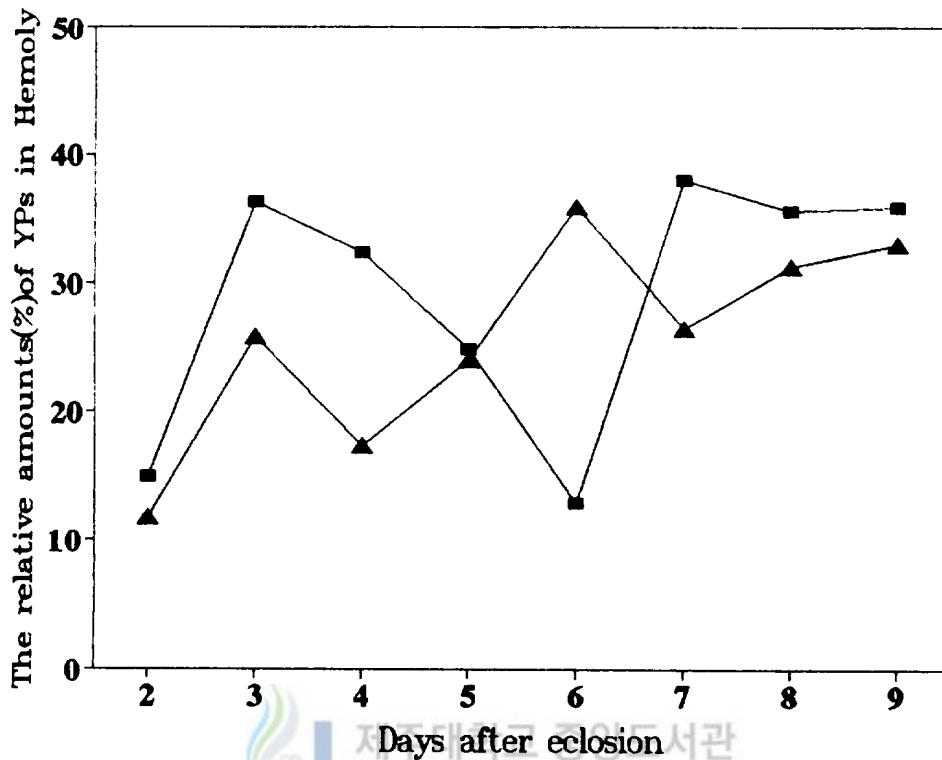


Fig.8. Label incorporation into the yolk proteins (YPs) and accumulated YPs in hemolymphs derived from normal females during development of *Drosophila* sp.(*robusta* group). Autoradiograph and coomassie blue stained gels of experiment in Fig.7 were scanned using by microdensitometer. The relative amount of YPs bands among the total hemolymph proteins. Each point represents the mean of three separate experiments. ■, Label incorporation into YPs; ▲, Accumulated YPs.

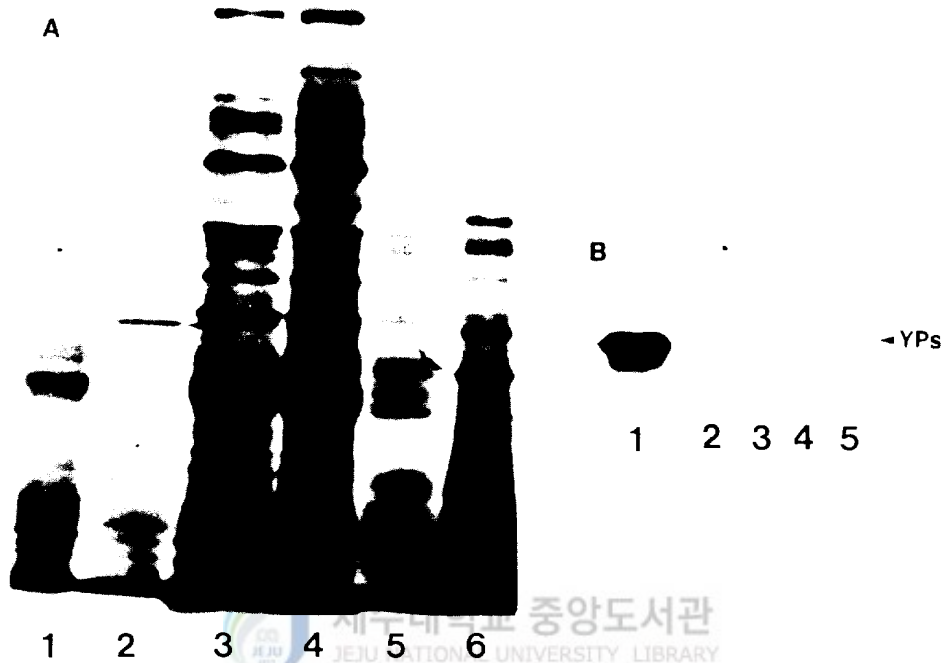


Fig.9. Autoradiograph analysis(A) and western blotting(B) of the electrophoresed hemolymph from isolated abdomens treated with different concentrations of 20-HE. For each treatment 10 abdomens isolated at eclosion and aged for 24 hr were treated with 0.2  $\mu$ l of 20-HE (in 10 % ethanol/Ringer's solution) per abdomen for 6 hr, then injected with 1  $\mu$ Ci/abdomen of  $^{35}$ S-methionine. The hemolymphs were collected with sample buffer, one-quarter of each sample were electrophoresed on an 10 % SDS-PAGE.

(A) Lane 1, control(10% Ethanol/Ringer's sol.); Lane 2,  $10^{-3}$  M 20-HE; Lane 3,  $10^{-4}$  M; Lane 4,  $10^{-5}$  M; Lane 5,  $10^{-6}$  M ; Lane 6, Hemolymph in 2 day-old female after eclosion

(B) Lane 1, purified YPs ; Lane 2, control ; Lane 3,  $10^{-5}$  M ; Lane 4,  $10^{-4}$  M ; Lane 5,  $10^{-3}$  M ; Lane 6,  $10^{-2}$  M.

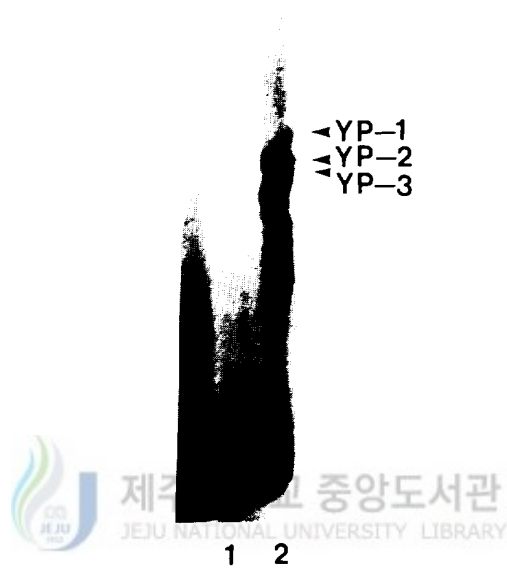


Fig.10. Autoradiograph analysis of the electrophoresed hemolymph from isolated abdomens treated with different concentration of 20-HE. For each treatment 10 abdomens isolated at 1 day-old after eclosion and aged for 24 hr were treated with 0.2  $\mu$ l of 20-HE (10 % ethanol/Ringer's sol.) per abdomen for 6 hr, then injected with 1  $\mu$  Ci/abdomen of  $^{35}$ S-methionine and the hemolymph were collected 2 hr later, and mix with sample buffer, prepared for 8-15 % gradient SDS-PAGE, autoradiographed. Lane 1, control (10 % Ethanol); Lane 2,  $10^{-3}$  M 20-HE.

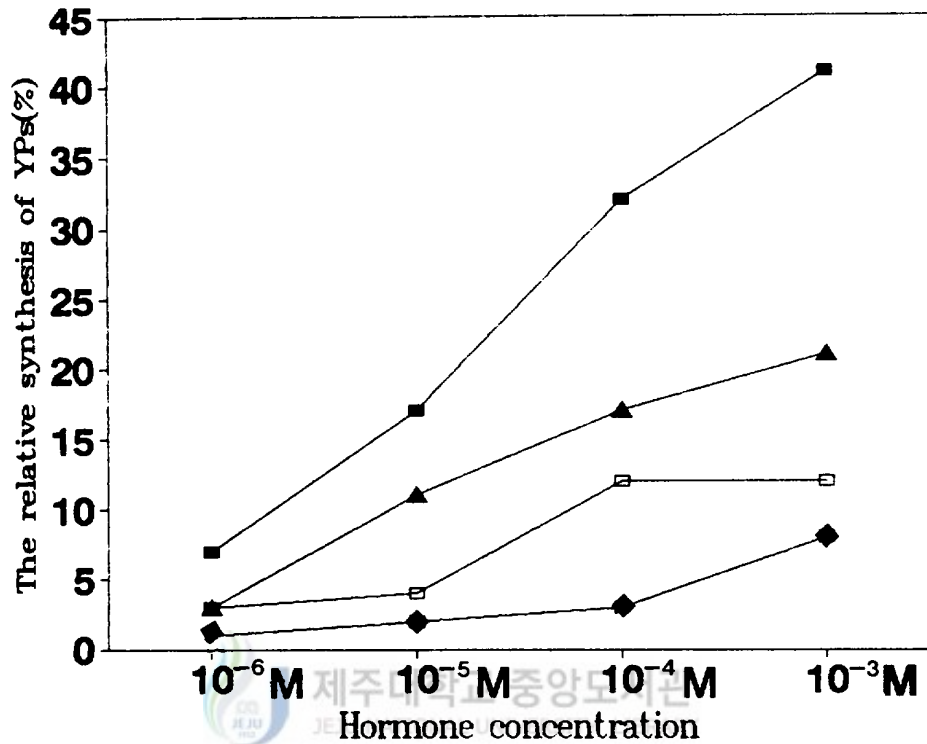


Fig.11. Quantification of the dose-response to 20-HE. Autoradiographs of the experiment in Fig.9 were scanned using microdensitometer and the label incorporation estimated by measuring the peak areas of the YP bands among the total hemolymph proteins. Each point represents the mean of three separate experiments. ■ ,total YPs; ▲ , YPs-1, □ , YPs-2; ◆ ,YP-3.

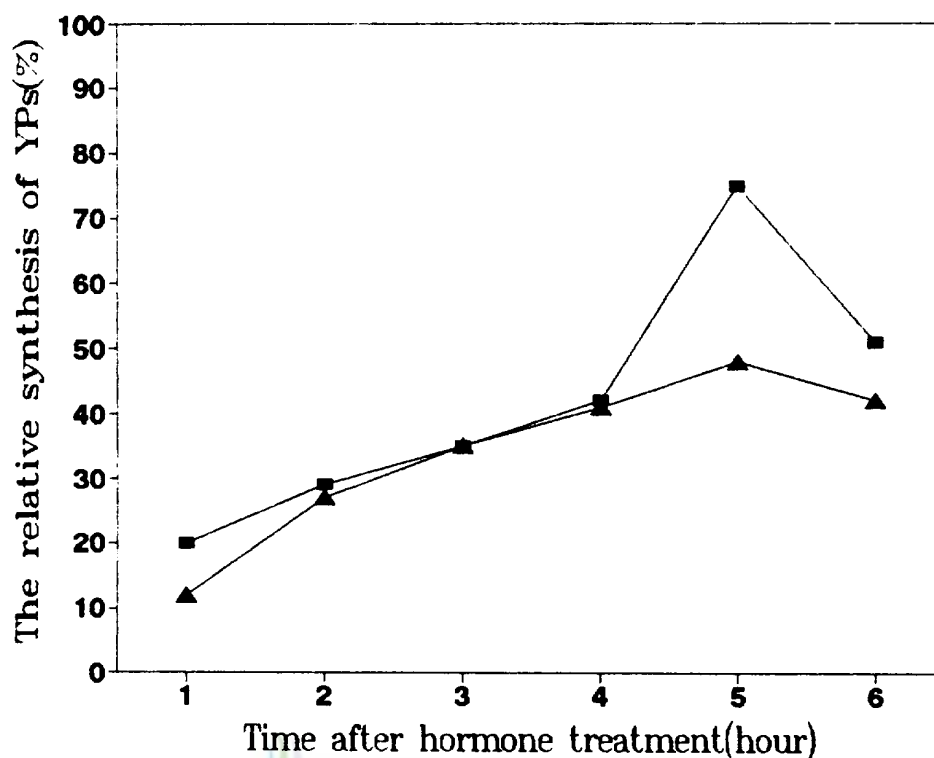


Fig.12. Time course of the response of isolated abdomens to 20-HE and JH III. A group of ten abdomens isolated from 1 day-old female after eclosion and aged for 24 hr was used in estimating each point. Abdomens treated with either 20-HE (0.2  $\mu$ l of  $10^{-3}$  M/abdomen) or JH III (0.2  $\mu$ l of  $10^{-3}$  M/abdomen) were labeled for 2 hr with 1  $\mu$ Ci of  $^{35}$ S-methionine at various interval after treatment, and hemolymph were collected and prepared for 10 % SDS-PAGE. The resulting autoradiographs of gels were scanned by microdensitometer and the label incorporation estimated by measuring the peak areas of the YP bands among the total hemolymph proteins. Each point represents the mean of three separate experiments. ■, 20-HE; ▲, JH III.



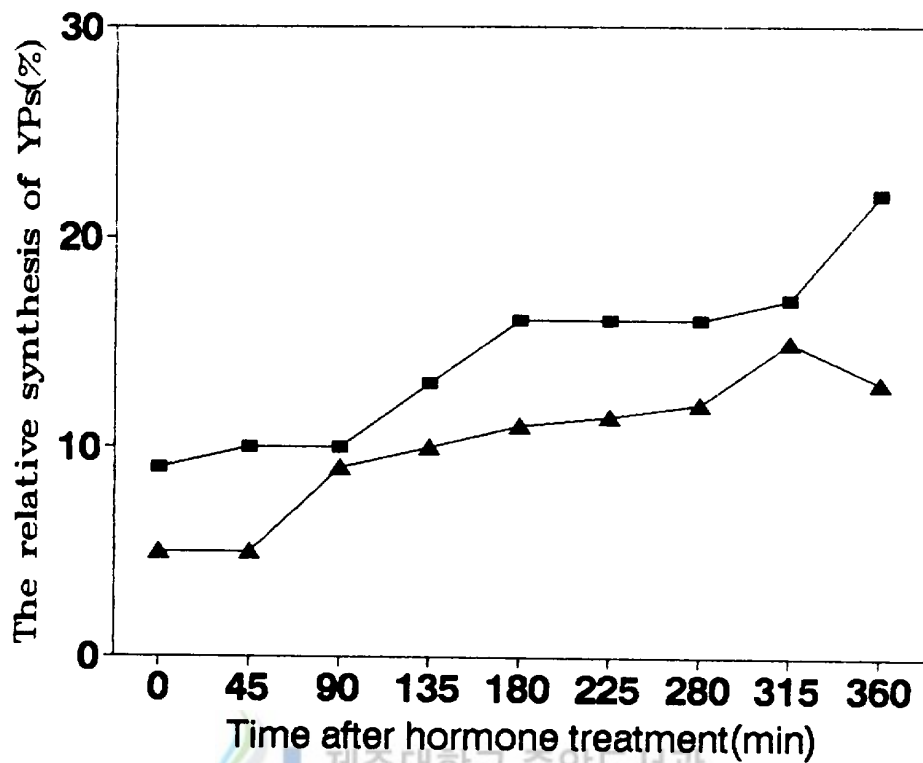


Fig.13. Time course of the response of fat bodies cultured in *in vitro* to 20-HE and JH III. A group of 10 body walls isolated from 30 min-old females after eclosion was treated with 20-HE or JH III (final concentration of  $10^{-3}$  M). At various interval after hormone treatment, the proteins were labeled for 2 hr with 10  $\mu$ Ci of  $^{35}$ S-methionine, and then the media were collected with sample buffer, prepared for 10 % SDS-PAGE. The resulting autoradiographs of gels were scanned by microdensitometer and the label incorporation estimated by measuring the peak areas of the YP bands among the total protein. Each point represents the mean of three separate experiments. ■ 20-HE, ▲ JH III.

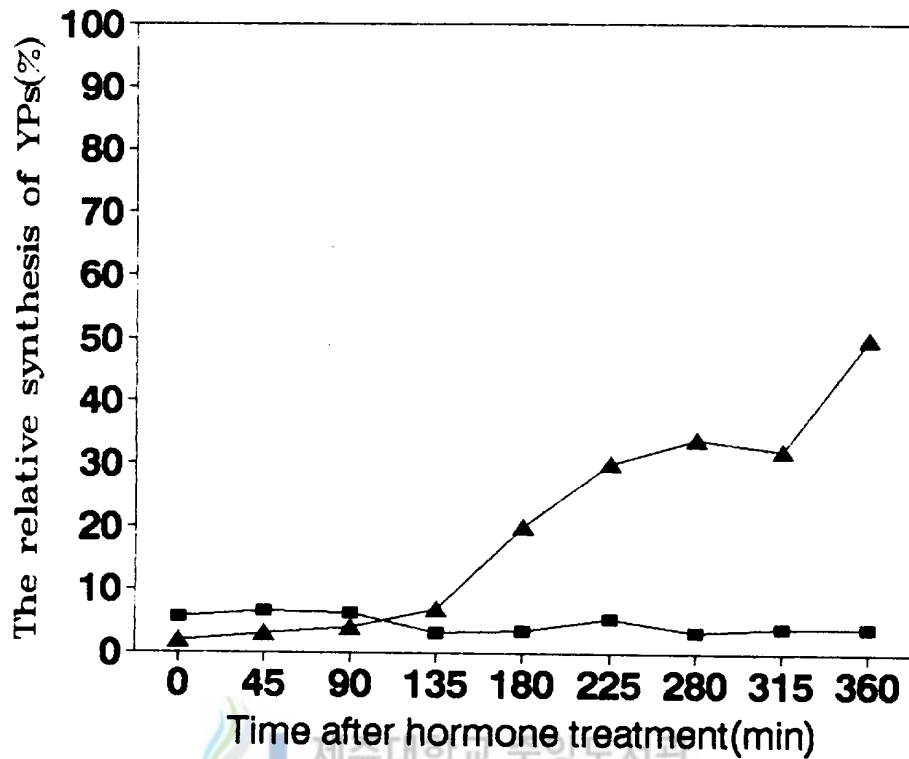


Fig.14. Time course of the response of ovaries cultured in *in vitro* to 20-HE and JH III. A group of ten pair ovaries isolated from 1 day-old female after eclosion was treated with 20-HE or JH III (final concentration of  $10^{-3}M$ ). At various interval after hormone treatment, the protein were labeled for 2 hr with  $10 \mu Ci$  of  $^{35}S$ -methionine, and then the media were collected with sample buffer and prepared for 10% SDS-PAGE. The resulting autoradiographs of gels were scanned by microdensitometer and the label incorporation estimated by measuring the peak areas of the YP bands among the total proteins. Each point represents the mean of three separate experiments. ■, 20 HE; ▲, JH III.

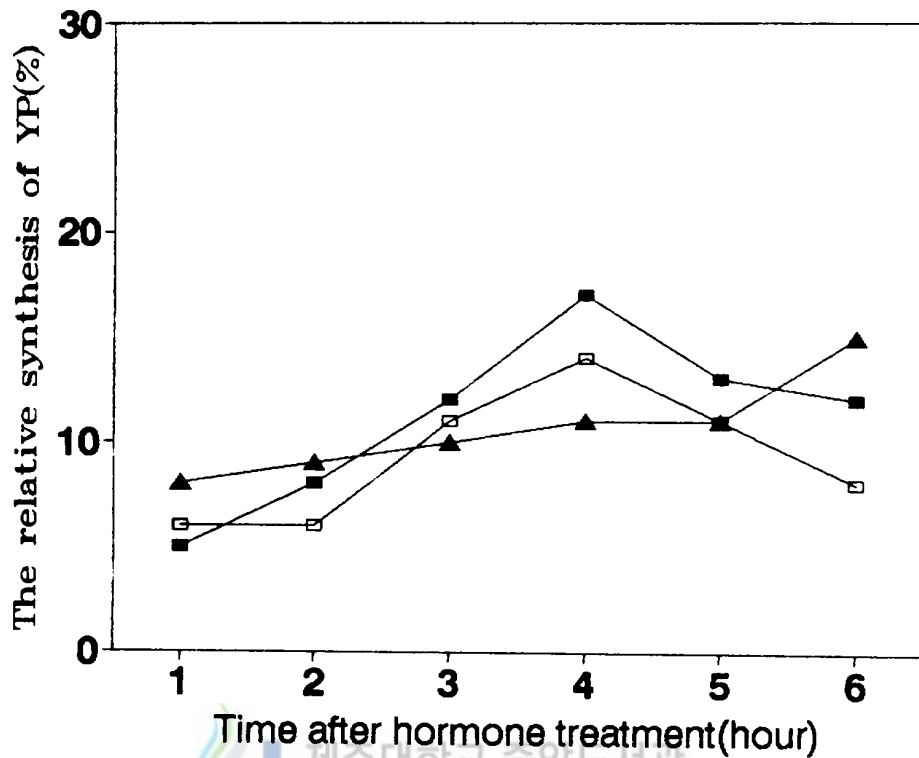


Fig.15. Time course of the response of fat bodies cultured *in vitro* to JH III and 20-HE. A group of 10 body walls isolated from 1 day-old female after eclosion was treated with 20-HE, JH III, and 20HE-JH III ( $10^{-3}$  M). At various interval after hormone treatment, the proteins were labeled for 2 hr with  $10 \mu\text{Ci}$  of  $^{35}\text{S}$ -methionine, and prepared for 10% SDS-PAGE. The resulting autoradiograph of the gel was scanned by microdensitometer, and the label incorporation estimated by measuring the peak areas of the YPs bands among the total protein. Each point represents the mean of three separate experiments. ■, 20-HE; ▲, JH III; □, 20HE-JH III.

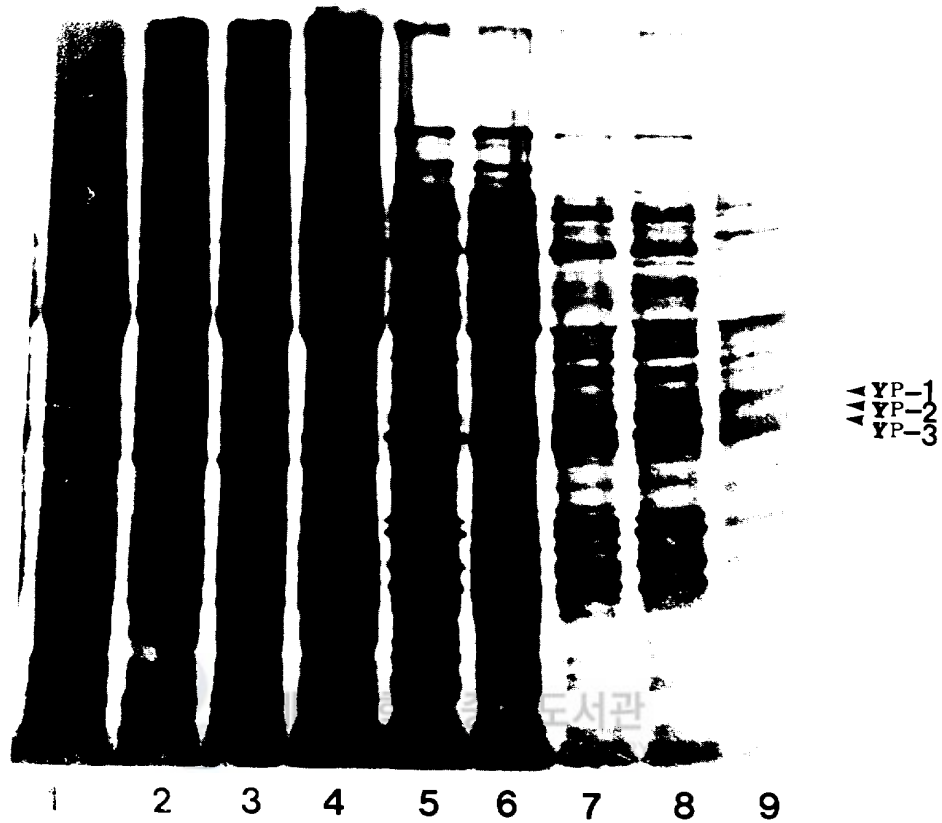


Fig.15. Autoradiograph analysis of the electrophoresed culture media. A group of 10 pairs ovaries from 1 day-old female after eclosion was treated with JH III ( $5 \mu\text{l}$  of  $10^{-3}$  M/20  $\mu\text{l}$  of media). At various interval after hormone treatment, the protein were labeled for 2 hr with  $10 \mu\text{Ci}$  of  $^{35}\text{S}$ -methionine, and then the media were collected with sample buffer and prepared for 10 % SDS-PAGE. The Coomassie blue-stained gel was dried and autoradiographed. Lane 1 , 0 min; Lane 2 , 45 min; Lane3, 90 min; Lane 4, 135 min; Lane 5, 170 min ; Lane 6, 215 min ; Lane 7, 260 min; Lane 8, 305 min ; Lane 9,360 min. after hormone treatment.

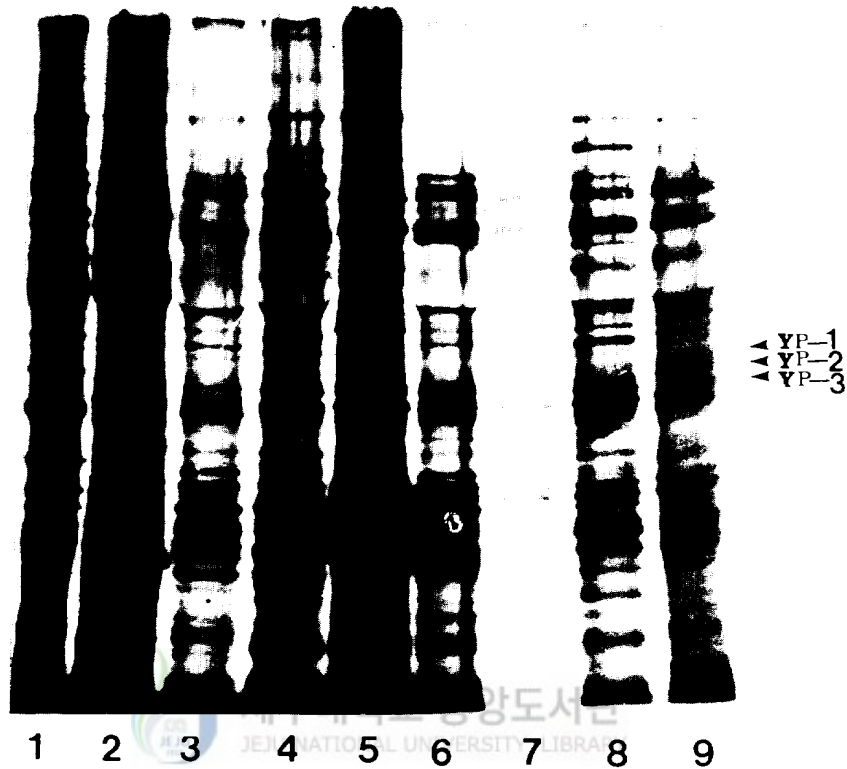


Fig.17. Autoradiograph analysis of the electrophoresed culture media. A group of 10 body walls isolated from 1 day-old female after eclosion was treated with JH III (5  $\mu$ l of  $10^{-3}$ M/20  $\mu$ l of media). At various interval after hormone treatment, the protein were labeled for 2 hr with 10  $\mu$ Ci of  $^{35}$ S-methionine, then the media were collected with sample buffer and prepared for SDS-PAGE. The Coomassie blue stained gel was dried and autoradiographed. Lane 1, 0 min; Lane 2, 45 min; Lane 3, 90 min; Lane 4, 135 min; Lane 5, 180 min. Lane 6, 225 min; Lane 7, 280 min; Lane 8, 325 min; Lane 9, 360 min. after hormone treatment.

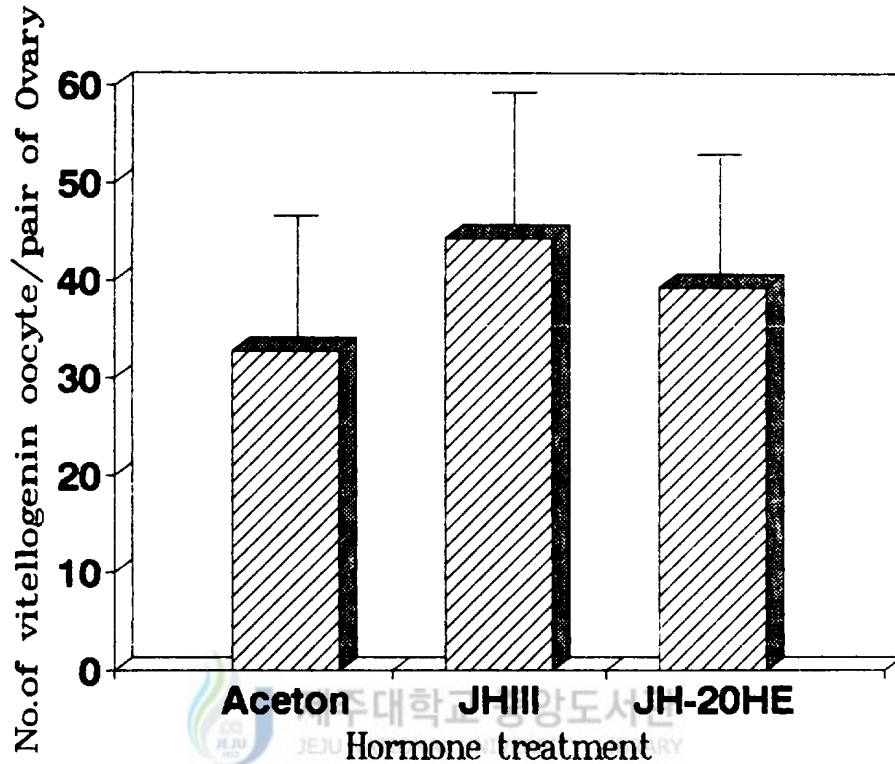


Fig.18. The effects of JHIII treatment on vitellogenesis of *Drosophila* sp.(robusta species group). A group of 2 days old females after eclosion was treated with 2  $\mu$ l of acetone(control) or 2  $\mu$ l of  $10^{-3}$ M JHIII per abdomen. At 6 hr after treatment the ovaries were dissected in Ringer's., and all vitellogenin oocyte were counted under stereomicroscope according to King (1970).

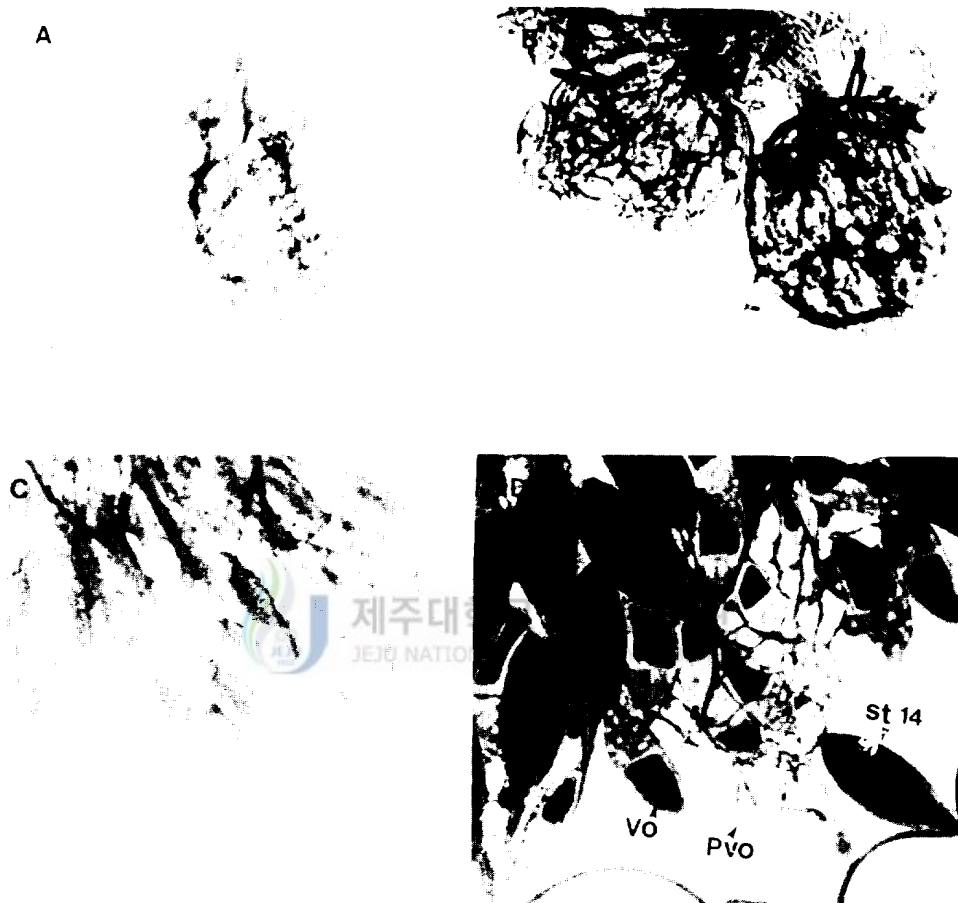


Fig.19. Morphology of ovaries derived from normal female during development of *Drosophila* sp.(robusta species group). A) 1 day-old female, B) 2 days-old female, C) 3 days-old female, D) 4 days-old female. Abbreviation: pvo.;previtellogenic oocytes, vo.; vitellogenic oocytes, st 14; stage-14 oocytes.

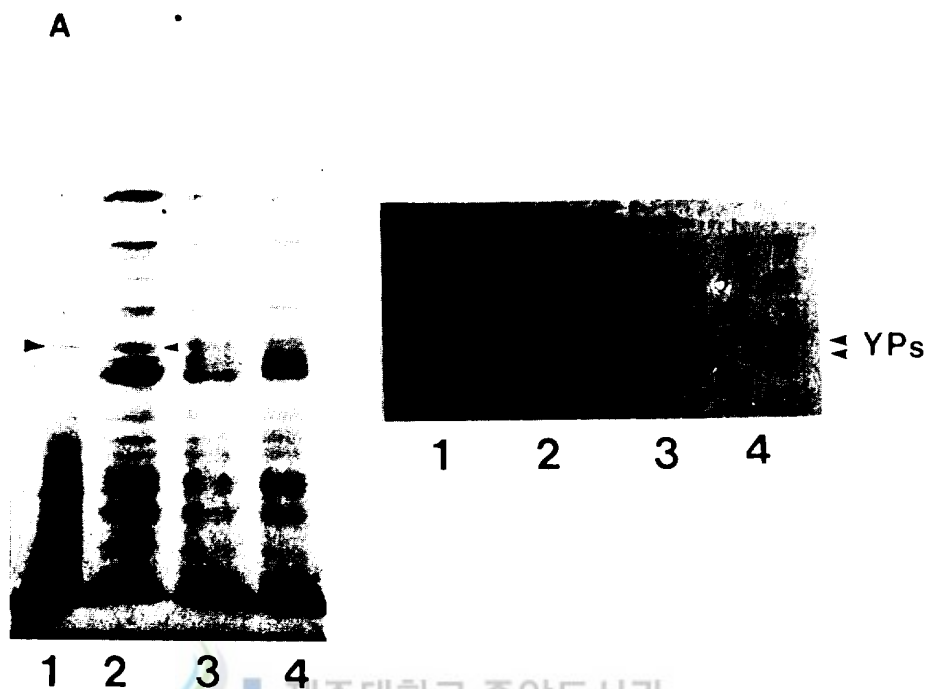


Fig.20. SDS-PAGE of hemolymph polypeptides(A), and Western blotting (B) showing induction of yolk polypeptide synthesis in males by 20-HE. A group of abdomens isolated from mature males were treated with various concentration of 20-HE. After incubation for 6 hr, the newly synthesized hemolymph proteins were labeled by injecting  $1 \mu\text{Ci}$  of  $^{35}\text{S}$ -methionine. Western blot was reacted with anti-yolk-protein antiserum.

- A. Autoradiograph; Lane 1, 2 days-old female hemolymph; Lane 2, 3 days-old male (20-HE.  $10^{-3}$  M); Lane 3, 3 days-old male (20-HE  $10^{-4}$  M); Lane 4, 3 days-old male (20-HE  $10^{-5}$  M).
- B. Western blotting; Lane 1, 3 days-old male (20-HE.  $10^{-5}$  M); Lane 2, 3 days-old male (20-HE.  $10^{-4}$  M); Lane 3, 3 days-old male (20-HE.  $10^{-3}$  M); Lane 4, 3 days-old male (20-HE,  $10^{-2}$  M).



#### IV. 고 찰

제주먹초파리(*Drosophila* sp.: *robusta species group*)에서 분리하여 동정된 3가지 난황 단백질의 분자량은 48 KD(YP-1), 47 KD(YP-2), 46 KD(YP-3)로서 큰 차이가 없이 서로 비슷하였는데, 이는 *D. melanogaster* (46 KD, YP-1: 45 KD, YP-2: 44 KD, YP-3)나 *D. grimshawi*(46.7 KD, YP-1: 45.5 KD, YP-2: 43.5 KD, YP-3)에서 보고된 바와 유사하였다 (Bownes and Hanes, 1978; Warren et al., 1979; Hatzopoulos and Kambysellis, 1987a, 1987b). 이들 3종류의 난황 단백질은 2 차원 전기영동상에서 다른 pI 값을 보였다. *D. melanogaster*의 난황 단백질의 pI는 7.0에서 7.2 좁은 범위에 있지만(Mintzas and Kambysellis, 1978), 제주먹초파리(*Drosophila* sp.)에서는 그보다 낮고 다소 이질적인 pI 값(pH 5.6-6.2)의 분포를 보였다. 이것은 종에 따라 polypeptide의 1차 구조에 차이가 있음을 말해주는 것이라고 생각한다.

*In situ* peptide mapping의 결과도 3종류의 난황 단백질이 이질적인 polypeptide임을 보여 주었다. proteolytic fragment pattern을 비교했을 때 YP-1과 YP-2간의 상동성이 YP-3과의 것보다 컸다. *D. melanogaster*에서 난황 단백질의 유전자 염기배열에 따른 상동성은 YP-1과 YP-2 유전자가 63 %인 반면에 YP-1과 YP-3 유전자 사이의 상동성은 50 % 정도라고 보고되었다 (Barnet et al., 1980; Yan et al., 1987; Rina et al., 1991). 제주먹초파리(*Drosophila* sp.)의 난황 단백질도 proteolytic fragment pattern을 비교 한 바 이와 비슷한 상동성을 갖고 있는 것으로 추측된다. 그리고 2차원 전기영동상에서 보이는 난황 단백질의 pI 값의 이질적인 분포

는 posttranslation modification의 차이에 기인 한 것으로 사료된다 (Minitzas and Kambysellis, 1982; Bownes, 1982, 1986). Immunoblotting에 의해 확인된 vitellogenin은 난황 단백질 전구체인 것이 확실하였고, 암컷 성체에서만 검출되어 성 특이성이 확인되었으며, 난황 단백질과 분자량이 유사하였다.

*D. melanogaster*의 경우 난황 단백질은 우화 후 2시간부터 fat body에서 합성되기 시작하며 (Bownes and Hodson, 1980), 우화 후 1일이 지나면서 총 hemolymph 단백질 가운데  $44 \pm 2\%$  정도를 차지하는 것으로 보고 된 바 있다 (Belote et al., 1985). 그러나 제주먹초파리(*Drosophila* sp.)의 경우 난황 단백질 합성개시까지의 lag period가 48시간으로 *D. melanogaster*의 경우보다가 더 길었고, 3일째에는 이미 최대 합성량을 나타내어 9일까지 hemolymph protein 중 난황 단백질이 차지한 비율은  $29.5 \pm 8\%$  로서 *D. melanogaster* 보다 아주 낮았다. 제주먹초파리(*Drosophila* sp.)에서 난황 단백질 합성이 *D. melanogaster*에서 보다 지연되는 것은 제주먹초파리(*Drosophila* sp.)의 generation time이 *D. melanogaster* 보다 긴 것과는 부합되고 있어 종의 특성인 것으로 사료된다. 그러나 최대 합성량이 hemolymph protein에서 차지하는 비율이 종간에 차이를 보인 것이 종 특성에 의한 것인지 아니면 정량 상의 오차인지는 확실하지 않다.

JHⅢ와 20-HE는 *in vivo*와 *in vitro*로 처리 했을 때 암컷의 fat bodies에서 난황 단백질 합성을 유도하는 효과를 보였다. 20-HE는 우화 후 2시간된 암컷에서는  $10^{-3}$  M에서만 유도 효과를 나타낸 반면, 우화 후 1일된 암컷에서는 전 처리구( $10^{-3} - 10^{-6}$  M)에서 난황 단백질 합성이 유도 되었으며, 발생이 진행됨에 따라 이 호르몬에 민감해지는 것으로 보인다. 제주먹초파리(*Drosophila* sp.)의 난황 단백질 합성에 대한 20-HE의 효과는 *D. melanogaster*에서 보다 24시간 이상 지연되어 나타났다. 이는 제주먹초파리

(*Drosophila* sp.)의 성숙 과정에서 우화 후 2일째부터 난황 단백질의 전구체인 vitellogenin이 합성되는 시기의 차와 일치한다. JHⅢ는 우화 후 2시간된 암컷의 fat bodies에서는 유도효과를 보이지 않았지만, 우화 후 1일된 암컷에서의 효과는 20-HE와 비슷한 수준이었다. 절단된 복부를 1일 동안 ligation한 후 20-HE와 JHⅢ을 처리하여 fat body에서 합성된 난황 단백질 양상을 보면, 20-HE만을 처리한 것과 20-HE와 JHⅢ을 복합하여 처리한 것은 호르몬 처리 후 4시간에서 합성이 최대가 된다. 반면에 JHⅢ만을 처리한 것은 5시간까지는 서서히 증가하다가 6시간째에 상승 폭이 커진 결과로 볼 때, 20-HE와 JHⅢ이 작용 효과를 나타내는 시기에 차이가 있을 뿐 아니라 두 호르몬이 복합되었을 때 JHⅢ의 효과는 20-HE의 효과에 가려지는 것으로 보인다.

우화 후 1일된 암컷으로부터 적출하여 *in vitro*에서 배양된 fat bodies와 ovaries에서도 20-HE와 JHⅢ 처리로 난황 단백질 합성이 유도되었지만 *in vivo*에서의 효과보다 저조하였다. Ovaries에서는 20-HE의 효과보다 JHⅢ의 효과가 상당히 높았다. Vitellogenic oocyte의 발달에는 JHⅢ 단독 처리가 20-HE와 JHⅢ을 복합하여 처리한 것보다 큰 효과를 보였는데, 이 결과는 JHⅢ이 난소가 hemolymph로부터 vitellogenin을 uptake하는 것을 촉진하고 있음을 시사하는 것으로 사료된다(Bownes and Hodlson, 1980; Giorgi et al., 1988; Gutzeit, 1980; Isaac et al., 1982). 또한 이 결과는 anti-juvenile hormone(Benzodioxole J2581)을 처리하였을 때의 oocyte 발달을 억제한다는 Song 등(1990)의 결과와 Methoprene(Juvenile 호르몬 유사물질)을 처리하여 oocyte의 현저한 발달 효과를 나타낸다는 보고와 일치 하였다(Schwartz et al., 1985).

*D. grimshawi*의 난황 단백질은 난소의 난포상피(follicle epithelium)에서 합성되는데, 난모세포(oocytes) stage 8에서부터 11단계에 이르기까

지 합성되는데 stage 11에서 최고 수준이 된다(Hatzopoloulos and Kambysellis, 1987a, 1987b; Kambysellis et al., 1986). *D. grimshawi*의 3 개의 난황 단백질 유전자는 서로 비상호적으로 발현이 되나(Kambysellis et al., 1986), *D. melanogaster*에서는 이들 난황 단백질 유전자 발현의 상호적으로 조절된다 (Bownes, 1990). *Drosophila* sp. 난황 단백질 유전자 발현 조절은 fat body와 ovary에서 양적인 차이는 있지만 3 개가 동시에 검출 되는 것으로 보아 이들의 유전자는 상호적으로 발현 조절되는 것으로 사료되나 앞으로 이에 관해서는 앞으로 진전된 연구가 요구된다.

*Drosophila*의 여러 종의 수컷에서 20-HE는 난황 단백질 합성을 유도 하는 것으로 보고되었다 (Jowett and Postlethwait, 1980; Postlethwait et al., 1980; Kozma and Bownes, 1986a, 1986b). *Drosophila* sp.의 수컷에서도 20-HE에 의해 난황 단백질의 합성이 유도되었으나, *D. melanogaster*에서 보다는 lag time이 길고, 높은 농도의 호르몬을 요하였다.

*D. melanogaster*에서 난황 단백질 유전자 발현이 성 특이적으로 일어나는 상황을 설명하는 데 두가지 관점이 있다. 그 중 하나는 *D. melanogaster*의 수컷과 암컷에서 20-HE의 titres에 차이가 있다는 관점으로(Hodgetts et al., 1977; Rubenstein et al., 1982; Shwartz et al., 1985), Bownes 등(1984)에 의하면 *Drosophila* 성체에서의 ecdysteroid 농도는 암컷이 수컷보다 약 두배 정도 높다고 하였다. 다른 하나는 두 성에서 modulating hormone 수준의 차이 보다는 성결정 유전자의 지배를 받는다는 관점이다(Belote et al., 1985; Bownes et al., 1987; Burtis et al., 1991). Burtis 등(1991)은 성결정 유전자 중에 하위단계에 있는 *dsx* 산물이 난황 단백질 유전자 발현을 조절하는 switch의 on/off를 조절한다고 하였다. 즉 female-specific한 *dsx* 산물(52 KD)이 난황 단백질 유전자의 상류부위(-888bp - -163bp)에 있는 enhancer sequence와 결합하여 난황 단백질

유전자의 발현을 조절한다는 것이다. 그러나 20-HE은 노랑 초파리의 수컷과 암컷에서 난황 단백질의 합성을 유도하는 데 필수적이다(Bowmes and Nothiger, 1981 ; Bowmes, 1989). 따라서 호르몬에 의한 난황 단백질 유전자의 발현기작은 성결정 유전자에 의한 발현기작을 능가하는 것으로 보인다. 앞으로 복잡한 난황 단백질 유전자의 조절양상을 분자 수준에서 이해하기 위해서는 난황 단백질 유전자 발현에 영향을 주는 trans-acting factors( 호르몬-수용체 단백질 복합체, 조절 단백질, double sex gene 등)와 이들이 결합하는 cis-acting elements간의 상호작용에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 적 요

초파리(*Drosophila*)의 난황 단백질은 fat body 와 ovary에서 합성되며, 이들의 합성은 20-hydroxyecdysone과 juvenile hormone에 의하여 조절이 된다. 본 연구는 제주먹초파리(*Drosophila* sp.; *robusta species group*)의 난황단백질을 순수 분리하여 부분적인 화학 특성을 밝히고, 난황 단백질의 합성에 미치는 호르몬의 영향을 조사하기 위하여 수행되었다.

초기배아 에서 순수 분리된 난황 단백질은 *in situ* peptide mapping과 2차원 전기영동, 면역학적 분석 결과 3개의 독특한 polypeptide로 구성되어 있었다. SDS-PAGE로 결정된 이들의 분자량은 YP-1이 48,000, Yp-2가 47,000, 그리고 YP-3는 46,000 dalton이었다. 그리고 이들의 등전점은 pH 5.93에서 6.54 범위의 이질적인 분포를 보였다.

제주먹초파리(*Drosophila* sp.)의 female에서 난황단백질은 우화 후 48시간 후부터 합성되기 시작하여 3일 부터 9일된 성체의 총 hemolymph 단백질의  $29.5 \pm 8 \%$ 를 차지했다. Fat body와 ovary는 *in vivo*와 *in vitro*에서 20-HE와 JH-III처리에 반응하여 난황단백질을 합성하였다. Eclosion 후 6시간된 female 복부에  $^{35}\text{S}$ -methionine을 주입해서 hemolymph 단백질을 분석 하면 , 난황 단백질이 검출되지 않지만, 20-HE을 처리하면 난황 단백질 합성이 유도 되었다. 20-HE는 female의 fat body를 자극하여 난황 단백질 합성을 유도하였지만 ovary에서는 별 영향이 없었다. 특히 정상적으로 난황 단백질이 합성되지 않는 male에서도 20-HE처리로 난황 단백질의 합성을 유도 할 수 있었다. 그러나 male은 female 보다 20-HE에 대한 민감도가 100배 정도 낮았다. JHIII는 fat body와 ovary에서의 난황 단백질 합성을 유도 하였는데, ovary에서의 효과가 더 효율적이었다.

## VI. References

- Arking, R., 1978. Tissue-, Age-, and Stage-specific patterns of protein synthesis during the Development of *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 63:118-127.
- Bailey, B. C., 1984. The production of antisera. In: Method in Molecular Biology (J. M. Walker, ed.) Humana press, Clifton, New Jersey, Vol.1, pp. 295-300.
- Baker B. S. and J. M. Belote, 1983. Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. Ann. Rev. Genet. 17:345-393.
- Barnett T., C. Pacht, P.J. Gergen, and P.C. Wensink, 1980. The isolation and characterization of *Drosophila* yolk protein genes. Cell 21: 729-738.
- Belote, J. M., A. M. Handler, M. F. Wolfner, K. J. Livak, and B. S. Baker, 1985. Sex-Specific Regulation of yolk protein gene expression in *Drosophila*. Cell 40:339-348.
- Benford, H. H. and J.T. Bradley, 1986. Early detection and juvenile hormone-dependence of cricket vitellogenin. J. Insect Physiol. 32:109-116.
- Bouletreau-Merle, J. 1989. Genetic divergence in the kinetic of ovarian activity and brain control in virgin *D. melanogaster* females. J. Insect Physiol. 36:119-125
- Bownes, M., 1982. The role of 20-hydroxyecdysone in yolk polypeptide synthesis in *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 28: 317-328.
- Bownes, M., 1986. Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein). Annu. Rev. Entomol. 31: 507-531.

- Bownes, M., 1989. The roles of juvenile hormone, ecdyson and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. *J. Insect Physiol.* 35: 409-413.
- Bownes, M., and M. Blair, 1986. The effects of a sugar diet and hormones on the expression of the *Drosophila* yolk protein genes. *J. Insect Physiol.* 32:493-501.
- Bownes, M., A. Dubendorefe, and T. Smith, 1984. Ecdysteroid in adult males and females of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 30: 823-830.
- Bownes, M. and B. D.Hames, 1977. Accumulation and degradation of three yolk protein in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 200: 149-156.
- Bownes, M. and B. D. Hames, 1978. Analysis of yolk protein in *Drosophila Melanogaster*. translation in a cell-free system and peptide analysis. *FEBS Lett.* 96: 327-330
- Bownes, M. and B. A. Hodson, 1980. Mutant fs(1)1163 of *Drosophila melanogaster* alters yolk protein secretion from the fat body. *Molec. Gen. Genet.* 180:411-418.
- Bownes, M and R. Nothiger, 1981. Sex-determining genes and vitellogenin synthesis in *Drosophila* *Molec.gen Gent.* 182: 222-228
- Bownes, M., A. Dubendorfer and T. Smith, 1984. Ecdysteroids in adult males and females of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.* 30: 823-830
- Bownes, M. and G. Reid, 1990. The role of the ovary and nutritional signals in the regulation of fat body yolk protein gene expression in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 36: 471-479.
- Bownes, N., A. Scott and A. Shirras, 1988. Dietary components



- modulate yolk protein gene transcription in *Drosophila melanogaster*. *Development*. 103: 119-128.
- Bownes, M., A. Scott and M. Blair, 1987. The use of an inhibitor of protein synthesis to investigate the roles of ecdysteroids and sex-determination genes on the expression of the genes encoding the *Drosophila* yolk proteins. *Development*. 101:931-941.
- Brennan, M. D., A. J. Weiner, T. J. Goralski and A.P. Manhowald, 1982. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 89: 225-236.
- Burtis, K. C., K. T. Coschigano, B. S. Baker and P. C. Wensink, 1991. The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO. J.* 10: 2577-2582.
- Cleveland, D. W., S. G. Fischer, M. W. Kirschner, and U. K. Laemmli, 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106.
- Fallon, A. M., H.H. Hagedorn, G. R. Wyatt and H. Laufer, 1974. Activation of vitellogenic synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. *J. Insect Physiol.* 20: 1815-1823.
- Garabedian M. J., B. M. Shepherd, and P. C. Wensink, 1986. A Tissue-Specific Transcription Enhancer from the *Drosophila* Yolk protein 1 Gene. *Cell* 45:859-867.
- Garabedian M. J., M. C. Hung, and P. C. Wensink, 1985. Independent control elements that determine yolk protein gene expression in alternative *Drosophila* tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 1396-1400.
- Giorgi, F., P. Andolfi, I. Spinetti, M. Masetti, and J. Postlethwait,

1988. In Vivo uptake of hemolymph from a female sterile mutant into wild type ovaries of *Drosophila melanogaster*. Insect Physiol. 32:59-69.
- Gutzeit, H.O., 1980. Yolk synthesis in ovarian follicles of *Drosophila*. Wilhem Roux Arch. Dev. Biol. 189: 221-224.
- Hatzopoloulos, P. and M. P. Kambysellis, 1987a. Differential and temporal expression of the vitellogenin genes in *Drosophila grimshawi*. Mol. Gen. Genet. 210: 564-571.
- Hatzopoulos, P. and M. P. Kambysellis, 1987b. Isolation and structural analysis of *Drosophila grimshawi* vitellogenin genes. Mol. Gen. Genet. 206: 275-284
- Hung, M-C., T. Barnett, C. Woolford, and P. C. Wensink, 1982. Transcript maps of the *Drosophila* yolk protein genes. J. Mol. Biol. 154: 581-602.
- Issac P. G. and M. Bownes, 1982. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. Eur. J. Biochem. 123:527-534.
- Jowett, T. and J. H. Postlethwait, 1981. Hormonal regulation of synthesis of yolk proteins and a larval serum protein(LSP-2) in *Drosophila*. Nature 292: 633-635.
- Kambysellis, M. P., P. Hatzopoulos, E. W. Seo, and E. M. Creddock, 1986. Non-coordinate synthesis of the vitellogenin proteins in tissues of *Drosophila grimshawi*. Dev. Genet. 7:81-97.
- King R. C., 1970. The structure and functioning of the reproductive system of the adult. In ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. pp. 33-67. Academic Press. New York.
- Koepppe, J. K., John, K. Koepppe, M. Fuchs, T. T. Chen, L-M. Hunt, G. Kovalick, and T. Briers , 1985. The Juvenile hormone in

- reproduction.
- Kozma, R. and M. Bownes, 1986 a. Yolk protein induction in males of several *Drosophila* species. *Insect Biochem.* 16:263-271.
- Kozma, R. and M. Bownes, 1986 b. Identification and comparisons of the yolk polypeptides and the genes which code for them in *D. melanogaster* sibling species. *Mol. Gen. Genet.* 204:302-309.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.
- Lewis, E. B., 1960. A new standard food medium. *Dro. Inf. Ser.* 34:117-118.
- Lowry, O., A. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 266-275.
- Maroy, P., G. Kaufmann and A. Dubendorfer, 1988. Embryonic ecdysteroids of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 34: 633-637.
- Mintzas, A. C. and M. P. Kambysellis, 1982. The yolk protein of *Drosophila melanogaster*; Isolation and characterization. *Insect Biochem.* 12: 25-33.
- Nardelli, D., S. Gerber-Huber, Fred D. van het Schip, M. Gruber, Geert AB, and W. Wahli, 1987. Vertebrate and Nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor. *Biochemistry* 26:6397-6402.
- Nicholas, J. Coppard, Knud poulsen, Hans O. Madsen, Jane Frydenberg, and Brian F. C. Clark, 1991. 42 Sp48 inprevitellogenic *Xenopus* Oocytes is structurally homologous to EF-1A and May be a stage-specific elongation factor. *J. Cell Biol.* 56:1654-1661.
- Nothiger, R., M. Jonglez, M. Leuthold, P. Meier-gerschwiler and T. Weber, 1989. Sex determination in the germ line of *Drosophila*

- depends on genetic signals and inductive somatic factors.  
Development 107: 505-518.
- O'Farrell, P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.
- Ouchterlony, O., 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. In progress in Allergy, Vol. 5, pp. 1-78. Karger and New York.
- Postlethwait, J. H., M. Bownes, and T. Jowett, 1980. Sex phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 79:379-387.
- Postlethwait, J. H. and A.M. Handler, 1979. The roles of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 25: 455-460.
- Racciopi, j. V., H. H. Hagedorn, and J. M. Calvo, 1984. Physiological mechanisms controlling the reproductive cycle of the mosquito *Aedes aegypti*. In Advances in invertebrate Reproduction 3, Proc. 3rd Int. Symp. Int. Soc. Invertebr.
- Rina, M., and C. Savakis, 1991. A cluster of vitellogenin genes in the mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*: sequence and structural conservation in dipteran yolk proteins and their genes. Genetics 127:769-780.
- Rubenstein, E. C., T. J. Kelly, M. B. Schwartz and C.W. Woods, 1982. In vitro synthesis and secretion of ecdysteroids by *Drosophila melanogaster* ovaries. J. Exper. Zool. 223:305-308.
- Schwartz, M. B., T. J. Kelly, R. B. Imberski, and E. C. Rubenstein, . 1985. The effects of nutrition and methoprene treatment on ovarian ecdysteroid synthesis in *Drosophila melanogaster*. J.

- Insect Physiol. 29: 947-957
- Sharrock, W. J., M. E. Sutherlin, K. Leske, T. K. Cheng and T. Y. Kim, 1990. Two distinct yolk lipoprotein complexes from *Caenorhabditis elegans*. J. Bio. Chem. 265:14422-14431.
- Shirras, A. and M. Bownes, 1987. Separate DAN sequences are required for normal female and ecdysone-induced male expression of *Drosophila melanogaster* yolk protein 1. Molec. Gen. Genet. 210: 153-155.
- Song, Q., M. Ma., T. Ding, J. Ballarino and S. Wu, 1990, Effect of a benzodioxole, J2581(5-Ethoxy-6-(4-methoxyphenyl)methyl-1,3-benzodioxole), on vitellogenesis and ovarian development of *Drosophila melanogaster*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 37:12-23.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: Procedure and some application. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- Walter W., I. B. Dawid, G. U. Ryffel, and R. Weber, 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. Science 212:298-304.
- Warren, T. G., and A. P. Mahowald, 1979a. Isolation and chemical characterization of the three major yolk polypeptides from *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 68: 130-139.
- Warren T. G., and A. P. Mahowald, 1979b. Two processing steps in the maturation of vitellogenin polypeptide in *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76:2848-2852.
- Wheeler, D. E. and J. K. Kawooya, 1990. Purification and Characterization of honey bee vitellogenin. Arch. Insect Biochem. and Physiol. 14:253-267.

- 
- Williams, J. L. and M. Bownes, 1986. Reduced stability of RNA coding for yolk polypeptide 3 in *Drosophila melanogaster* ovary. Eur. J. Biochem. 161:95-101
- Yan, Y. L., C .J. Kunert and J. H. Postlethwait, 1987. Sequence homologies among the three yolk polypeptide(YP) genes in *Drosophila melanogaster*. Nucl. Acids Research 15:67-85



## 감사의 글

본 연구를 위하여 깊은격려와 사랑으로 지도하여주신 오문유 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 부족한 저를 이끌어 주신 김세재 교수님과 김원택 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

또한 많은 충고와 조언으로 이끌어 주신 허인욱 교수님, 오덕철 교수님, 이용필 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께 감사를 드립니다.

아울러, 생활을 같이하며 성원과 도움을 주신 여러선배님과 실험실후배들께도 감사를 드리며, 또한 지금까지 성원 하여주신 많은 분들께도 감사드립니다.

끝으로 항상 염려와 사랑으로 이끌어 주신 어머니와 형님께 고마움을 전하며, 또한 형수님과 제수씨 그리고 가족모두에게도 아울러 깊은 고마움을 전합니다.

