

꿀벌부채명나방 종령 유충 지방체에 의한 아포리포포린-III의 흡수

윤화경^{1*}

¹한서대학교 생명과학과

Apolipoprotein-III uptake by the last larval fat body in the wax moth *Galleria mellonella*

Hwa-Kyung Yun^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Hanseo University

요 약 아포리포포린-III (apoLp-III)를 꿀벌부채명나방 종령 유충 혈림프에서 KBr 농도구배 초원심분리와 겔크로마토그래피 (Sephadex G-100)를 이용하여 분리, 정제하였다. 본 연구에서는 아포리포포린-III가 꿀벌부채명나방의 종령 유충 지방체에 의해 흡수되는 지를 조사하였다. 종령 유충 지방체 조직을 FITC로 표지한 아포리포포린-III (FITC-apoLp-III)와 상온에서 30분간 배양하였다. 배양 후 형광현미경과 전기영동을 이용하여 FITC-apoLp-III가 지방체 조직으로 들어가는 지의 여부를 확인하였다. 그 결과 FITC-apoLp-III가 유충 지방체로 흡수된다는 사실을 알 수 있었다.

Abstract Apolipoprotein-III (apoLp-III) was isolated and purified from the last larval hemolymph of *Galleria mellonella* by the KBr gradient ultracentrifugation and gel chromatography (Sephadex G-100). In this paper, we examined that apoLp-III is taken up into the last larval fat bodies in *Galleria mellonella*. The last larval fat body tissues were incubated at room temperature for 30 min with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled apoLp-III (FITC-apoLp-III). Fluorescein microscopy and sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) revealed that the last larval fat body tissues internalize FITC-apoLp-III. The results show that the apoLp-III is taken up by the last larval fat body.

Key Words : Apolipoprotein-III, Fat bodies, FITC, SDS-PAGE

1. 서론

아포리포포린-I과 아포리포포린-II로 구성된 고밀도 리포포린은 곤충 혈림프내에서 지질을 운반하는 데 중요한 역할을 담당하는 단백질이다. 제3의 소단위인 아포리포포린-III는 분자량이 18 kDa정도인 단백질로 고밀도 리포포린을 둘러싸 소수성인 표면을 만들어 더욱 많은 양의 지질을 에너지 이용 장소인 생식소 (난소와 정소)와 비행근으로 운반하는 데 중요한 역할을 한다[1]. 또한, 아포리포포린-III는 지질 저장체인 트리아실글리세리드 (TAG)를 지질 운반체인 디아실글리세리드 (DAG)로 전환시켜 고밀도 리포포린으로 운반하여 주는 중요한 역할도 담당

한다[1]. 그리고 유충 중장에서 고밀도 리포포린은 DAG의 운반을 용이하게 하고, DAG를 지방체로 운반하여 트리아실글리세리드 (TAG)의 형태로 저장하는 것을 도와주는 역할도 한다고 알려져 있다 [2,3]. 리포포린은 아포리포포린-I과 II로 구성되어 있는 고밀도 리포포린과 이 고밀도 리포포린에 아포리포포린-III가 결합된 저밀도 리포포린이 존재하는 데, 저밀도 리포포린은 많은 양의 지질을 곤충이 비행시 필요로 하는 에너지로 제공한다. 또한 곤충이 난자 형성시에 많은 양의 에너지가 필요한데 이때 공급되는 에너지로는 DAG, 인지질, 스테로이드 같은 지질 뿐만 아니라 리포포린과 아포리포포린-III와 같은 단백질도 필요하므로 이들 지질과 단백질이 난소로

본 논문은 한서대학교 2012년도 교내연구비(121 이학 106)에 의해 지원되었음.

*Corresponding Author : Hwa-Kyung Yun(Hanseu Univ.)

Tel: +82-41-660-1345 email: kyung813@hanseo.ac.kr

Received May 21, 2013

Revised (1st July 1, 2013, 2nd July 13, 2013)

Accepted August 7, 2013

흡수된다는 사실이 최근에야 밝혀졌다[4]. 난소내에 존재하는 대부분의 단백질은 지방체에서 합성되어 혈림프로 방출된 후에 난소로 흡수되며, 흡수되는 과정은 수용체-매개 내포작용으로 일어난다는 사실이 보고 되어 있다. 또한 일부 소량의 단백질은 난소자체에서 합성하기도 한다고 알려져 있다 [5,6]. 아포리포포린-III가 난소에 에너지를 공급하기 위하여 흡수된다는 사실은 밝혀졌지만 지방체로 흡수된다는 사실은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구는 꿀벌부채명나방의 종령 유충 혈림프로부터 아포리포포린-III를 KBr 농도구배 초원심분리와 겔크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제한 후 형광물질 fluorescein isothiocyanate (FITC)로 표지한 아포리포포린-III (FITC-apoLp-III)를 제작하였다. 제작한 FITC-apoLp-III를 종령 유충 지방체와 상온에서 30분간 배양하여 아포리포포린-III가 지방체로 흡수되는지를 조사하였으며, 이 결과를 형광현미경과 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electro-phoresis (PAGE)를 이용하여 확인하였다.

2. 실험방법

2.1 곤충

꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) 유충을 자연사료 (소바)와 혼합한 인공 사료를 Han et al., [7]방법으로 배양하였다. 배양조건은 온도 32±1℃, 상대습도 75±5%, 광주기는 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 사용하였다. 또한 본 실험에서는 종령 유충을 사용하였다.

2.2 혈림프와 지방체의 적출

혈림프는 항응고 완충용액 (128 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.3 mM KCl, and 30 mM trisodium-citrate, pH 6.4)이 들어있는 차가운 튜브에 핀셋을 이용하여 유충 앞 다리로부터 혈림프를 추출하였다. 추출한 혈림프의 압화를 방지하기 위해 phenylthiourea (PTU)를 넣고 12,000 g (4℃)에서 5분 동안 혈구와 세포 잔유물을 제거하기 위해 원심분리한 후 상등액만을 취하여 사용할 때까지 -70℃에서 보관하였다.

지방체는 차가운 링거액 (128 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.3 mM KCl, pH 7.4)이 들어 있는 튜브에서 유충으로부터 해부하여 적출한 후 즉시 조직배양의 시료로 사용하였다.

2.3 아포리포포린-III의 정제 및 전기영동

13 ml 용량의 초원심분리용 튜브에 2.64 g의 KBr과 2

ml의 종령 유충 혈림프와 0.1 M phosphate saline (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.0)을 넣고 잘 혼합하여 최종밀도가 1.31 g/ml이 되게 한 후, 그 용액 위에 0.9 % NaCl (밀도 1.007 g/ml)을 넣어 최종 부피가 13 ml이 되게 하여 Beckman사의 초원심분리기 (XL-90) SW 41 Ti rotor에 넣고 4℃에서 40,000 rpm으로 16시간 동안 초원심분리하였다. 초원심분리가 끝난 후 리포포린을 제외한 분획 (lipophotin-free fraction)을 겔크로마토그래피용 시료로 사용하였다.

초원심분리후 리포포린을 제거한 분획을 겔크로마토그래피 (Sephadex G-100)을 행하였으며, column은 2 x 60 cm, flow rate는 30 ml/h으로 각 분획은 2 ml씩 취하였다. 용출 완충액으로는 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하였으며, 각 분획을 분광광도계 (Shimadzu UV-120)로 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아포리포포린-III가 존재하는 분획을 농축하여 정량한 후 최종적으로 분리된 아포리포포린-III를 SDS-PAGE를 이용하여 순수도를 확인하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli (1970) [8]방법에 따라 10% gel에서 이행하였다. 전기영동 후에 gel은 coomassie blue R 250으로 염색하였으며, 3.5% 아세트산을 포함한 30% 메탄올 용액으로 탈색하였다.

2.4 FITC-apoLp-III의 제조 및 지방체와의 배양

순수 정제한 아포리포포린-III (1 mg/ml)를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 형광물질 fluorescein isothiocyanate (FITC, 20 μl/ml)와 상온에서 1시간 동안 배양하였다[9]. FITC로 표지된 아포리포포린-III (FITC-apoLp-III)를 Sephadex G-25 PD-10 column (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 정제하였다.

정제한 FITC-apoLp-III (25 μg/ml)와 지방체 조직을 상온에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 지방체 조직을 식염수로 3번 세척하였으며 4% paraformaldehyde로 10분에서 30분정도 상온에서 고정하였다.

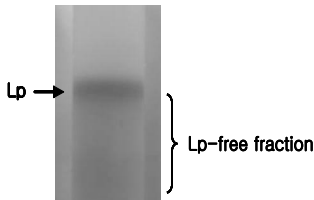
2.5 형광현미경 관찰

조직배양이 끝난 지방체를 형광현미경 (Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 관찰하였다. UV필터를 사용하여 형상은 AxioCam HRc 디지털 카메라로 관찰하고, Axio Vision Release 4.5 software (Zeiss)를 이용하여 기록하였다.

3. 결과

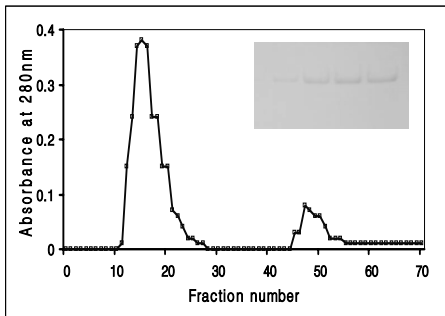
3.1 아포리포포린-III의 분리 및 정제

중령 유충 혈림프 2 ml을 KBr 농도구배 초원심분리를 한 후 리포포린을 제거한 분획을 아포리포포린-III를 정제하는 시료로 사용하였다[Fig. 1].



[Fig. 1] KBr density gradient ultracentrifugation of hemolymph *Galleria mellonella*. Lp, lipophorin

아포리포포린-III는 혈림프내에서 자유롭게 존재하는 형태와 리포포린에 제3의 소단위로 결합하는 형태의 두 종류가 존재한다. 유충 혈림프에는 리포포린에 결합하지 않은 형태의 아포리포포린-III가 존재하기 때문에 리포포린을 제거한 후 정제를 하는 것이 다른 단백질로부터 오염을 방지하는 좋은 방법이다. 따라서 본 실험에서는 KBr 농도구배 초원심분리를 행하였다.



[Fig. 2] Sephadex G-100 gel chromatography of the lipophorin-free fraction from KBr density gradient ultracentrifugation. The column was eluted 0.05 M phosphate buffer at a rate of 30 ml/h and the eluents were collected in 2.0 ml fractions. Upper right panel: SDS-PAGE of Sephadex G-100 fractions.

리포포린을 제거한 KBr 농도구배 초원심분리 분획 (Lp-free fraction)을 겔크로마토그래피 (Sephadex G-100)의 시료로 사용하였다. 그 결과 13에서 20번째에 해당되는 분획에서 높은 흡광도를 나타내었으며 Fig. 2, 이 피크에 아포리포포린-III가 존재한다는 것을 예상할 수 있었

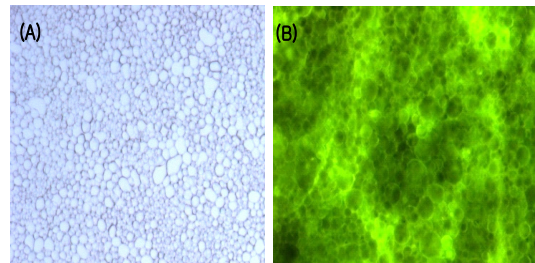
으며 그 분획을 전기영동한 결과 아포리포포린-III가 존재하였으며 순수정제가 되었음을 알 수 있었다[Fig. 2, upper right panel].

3.2 FITC-labeled-apoLp-III의 제조

순수 정제한 아포리포포린-III (1 mg/ml)를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 형광물질 fluorescein isothiocyanate (FITC, 20 μ l/ml)와 상온에서 1시간 동안 배양하였다. FITC로 표지된 아포리포포린-III (FITC-apoLp-III)를 Sephadex G-25 PD-10 column 을 이용하여 정제한 후 Yun (2009)의 방법대로 확인하였다[1].

3.3 아포리포포린-III의 지방체에 의한 흡수

아포리포포린-III가 지방체로 흡수되는 지를 확인하기 위하여 정제한 FITC-apoLp-III (25 μ g/ml)와 중령 유충 지방체 조직을 상온에서 30분 동안 배양하여 지방체 조직의 표면에 존재하는 아포리포포린-III를 식염수로 충분히 세척하여 제거함으로써 지방체 조직내에 존재하는 아포리포포린-III를 형광현미경으로 확인한 결과 아포리포포린-III가 지방체내로 흡수되어 지방체에 존재하였다[Fig. 3].



[Fig. 3] Fluorescence microscopic image of the last larval fat body tissues(B) obtained with fluorescein isothiocyanate (FITC). (A) shows differential interference contrast (DIC) image of the same frame represented in (B).

4. 고찰

곤충의 주요 혈림프 단백질인 리포포린은 많은 지질을 흡수기관인 중장(midgut)에서 저장 및 이용기관으로 지질을 운반한다. 특히 리포포린은 디아실글리세리드(DAG)의 저장기관인 지방체에서 이용기관인 난소(ovary)로 운반하여 알 성숙 과정 중에 일어나는 난황단백질의 형성에 필요한 물질을 제공한다고 보고되었다[10,11]. 리

리포린 자체의 내포작용 또한 다양한 곤충에서 일어난다는 사실도 밝혀져 있다[4,5]. 일반적으로 곤충은 AKH (Adipokinetic hormone)을 주입하면 많은 양의 지질을 비행근으로 운반하는데, 이때 아포리포포린-I과 아포리포포린-II로 구성되어 있는 고밀도 리포포린이 제3의 소단위인 아포리포포린-III가 결합하여 저밀도 리포포린으로 전환된다. 저밀도 리포포린은 더욱 많은 양의 지질을 에너지 사용기관으로 운반한다. 고밀도 리포포린은 지질 뿐만 아니라 리포포린 자체도 난소나 정소로 내포작용에 의해 각 기관내로 들어가 에너지나 영양분 생성에 사용된다고 밝혀져 있다[5]. 따라서 본 연구에서는 아포리포포린-III를 꿀벌부채명 나방의 종령 유충 혈림프로부터 분리, 정제하여 이들이 유충 지방체로 흡수되는 지를 형광현미경과 전기영동을 이용하여 조사하였다. 그 결과 지방체내에 형광물질이 존재하는 것으로 보아 아포리포포린-III가 유충 지방체내로 흡수된다는 새로운 사실을 찾아내었다 [Fig. 3]. 또한 아포리포포린-III도 저밀도 리포포린이 지질을 운반하는데 중요한 역할을 한다는 사실은 이미 밝혀져 있으나 에너지원으로 직접 이용된다는 보고는 최근에서야 알려지기 시작하였다. 그리고 아포리포포린-III가 꿀벌부채명나방의 성충 난소로 직접 흡수되어 에너지원으로 사용된다는 사실도 밝혀졌다[1]. 이미 밝혀진 바와 같이 고밀도 리포포린이 에너지를 필요로 하는 기관인 난소, 정소 및 비행근으로 지질을 운반하는 기능 뿐만 아니라 고밀도 리포포린 자체도 에너지원으로 이용된다. 따라서 본 연구의 결과로 아포리포포린-III가 유충 지방체로 흡수된다는 사실은 유충이 기관을 형성할 때 필요한 단백질 기본단위인 아미노산을 이용할 수 있는 저장단백질로서 활용이 가능하다는 새로운 사실을 밝혀냈다는 것이 중요하다. 또한 흡수된 아포리포포린-III가 유충 지방체내에서 어떤 단백질과 기관을 형성하는 데 이용을 하는 것인지를 밝혀내는 것이 앞으로 해야 할 과제이다.

References

[1] H.K. Yun, "Apolipophorin-III uptake by the adult ovary in the wax moth *Galleria mellonella*", *Journal of The Korean Academia-Industrial cooperation Society*, Vo1.10. No3, pp. 620-624, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2009.10.3.620>

[2] Z.E. Jouni, H.K. Yun, M.A. Wells, "Cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body in vitro: high-density lipophorin as the receptor", *J. Insect Physiol.*, 48, pp. 609 - 618, 2002.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00081-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00081-1)

[3] H.K. Yun, "The transfer of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*" *Journal of The Korean Academia-Industrial cooperation Society*, Vo1.12. No4, pp. 1770-1774, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2011.12.4.1770>

[4] E.S. Jung, J.H. Joe, H.K. Yun, "Lipophorin uptake by the larval fat body and adult ovary in the wax moth, *Galleria mellonella*", *Entomol. Res.*, 36, pp. 167 - 171, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5967.2006.00028.x>

[5] R. Ziegler, R.V. Antwerpen, "Lipid uptake by insect oocytes", *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36, pp. 264 - 272, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.014>

[6] R. Ziegler, M.M. Ibrahim, "Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*", *J. Insect Physiol.*, 47, pp. 623 - 627, 2001.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00158-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00158-X)

[7] J. Han, C.S. Lee, C.Y. Yun, B.H. Lee, Y.G. Ko, C.S. Kang, S.D. Lee, J.S. Hwang, S.W. Kang, H.R. Kim, "Cloning and expression of male-specific protein (MSP) from the hemolymph of greater wax moth, *Galleria mellonella* L.", *Arch. Insect Biochem. Physiol.* pp, 110-120, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/arch.10106>

[8] U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, pp, 680-685, 1970.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>

[9] D. Van Hoof, K.W. Rodenburg, D.J. Van der Horst, "Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells", *J. Lipid. Res.*, 44, pp, 1431 - 1440, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M300022-JLR200>

[10] C.S. Lee, J.H. Han, S.M. Lee, "Wax moth, *Galleria mellonella*, fat body receptor for high-density lipophorin (HDLp)", *Arch. of Insect Biochem.*, 54, pp 14 - 24, 2003a.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/arch.10095>

[11] C.S. Lee, J.H. Han, B.S. Kim, "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.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00066-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00066-3)

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