

## 밤바구미(*Curculio dentipes*) 유충의 cyclic AMP 농도와 cAMP-dependent protein kinase 활성화도 변화

류진수 · 김유경 · 이경로

건국대학교 이과대학 생물학과

밤바구미 유충기의 whole body로부터 cyclic AMP(cAMP)를 추출하여 농도 변화를 측정하였고 cyclic AMP-dependent protein kinase(PKA)를 부분 정제하여 활성화도 변화를 조사하여 cAMP 농도와 PKA 활성화도와 의 소장관계를 비교하였다. cAMP 농도와 PKA 활성화도는 HPLC와 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. cAMP 농도는 밤바구미 유충에서 월동전에 0.57  $\mu\text{M/g}$ 로 가장 높았고, 월동중에 0.14  $\mu\text{M/g}$ 로 감소하였다가 월동후에 0.29  $\mu\text{M/g}$ 로 증가하였다. 또한 PKA 활성화도는 월동전에 2.56 unit/mg로 가장 높았으며, 월동중에 0.62 unit/mg로 감소하다가 월동후에 07 unit/mg로 다시 증가하여 cAMP 농도 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 이는 월동전에 휴면에 대비하여 최대의 취식으로 지방체 축적이 가장 많았고, 월동중에는 지방체의 소비가 증대 되기 때문에 감소하였다가, 월동후 휴면 종결과 유충-번데기 탈피를 준비하기 위해 cAMP 농도와 PKA 활성화도는 다시 증가하였다.

**KEY WORDS:** cAMP, cAMP-dependent protein kinase, *Curculio dentipes*

곤충에서의 생리활성물질은 지방체를 비롯한 체내의 여러 기관과 조직에 축적되어 있거나 혈림프 속에 다양하게 존재하고 있는데, 이들 생리활성물질 중 특히 단백질, 탄수화물, 지질을 비롯한 지방산과 변태호르몬, 최근에는 효소류에 대한 연구가 계속되고 있다.

곤충에서 이들 물질의 생화학적 조성은 종과 발육단계에 따라 다양하다. 특히 변태과정, 영양상태, 내부환경 및 생리상태에 따라 변이를 보이며 양적 질적 변화와 물질대사, 생리적 기능, 영양조성, 호르몬 분비 등은 생체내 항상성 유지와 밀접한 관계를 가지고 있다.

곤충류의 단백질은 세포의 구성 성분인 동시에 효소 및 호르몬의 주요성분으로서 곤충의 성장과 발육에 크게 영향을 미친다(De Bianchi and Terra, 1976).

단백질 또는 peptide성의 호르몬은 세포막 통과에 어떤 기작이 필요하다. 이때 cyclic adenosine 3'-5' monophosphate(cAMP)가

대사작용과 발생단계의 호르몬 전달등의 제2차전달자(second messenger)로 작용한다(Beebe and Corbin, 1986). *Periplaneta americana*에서 trehalagon(Hanaoka and Takahashi, 1977), *Locusta migratoria*의 지방체에서 adipokinetic 호르몬(Gade, 1979), 그리고 dopamine(Bodnaryk, 1983)등의 호르몬은 세포막의 수용체와 결합하여 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 합성하고, cAMP는 cAMP-dependent protein kinase(PKA)의 전효소에서 regulatory subunit와 결합하여 catalytic subunit로 분해하며, 활성화된 유리 catalytic subunit는 여러 단백질 구성물을 인산화한다. 따라서 PKA가 활성을 이루도록 한다(Beavo *et al.*, 1975).

이러한 PKA의 활성 기작은 *Periplaneta americana* 지방체로 실험한 *in vitro*, *in vivo* 실험에서 확인 되었다(Hanaoka and Takahashi, 1978).

고등동물의 중추신경계를 포함한 다양한 조직에서 cAMP의 여러가지 효과는 protein kinase를 통해 매개된다(Greengard, 1976). 이 효소의 역할은 cAMP 작용의 전이 작용이 중심적인 것으로 생각되며, 촉매적 인산화를 일으켜 단백질의 생물학적 활성을 유도한다(Walsh, 1978). 인산화작용 탈인산가수분해효소는 phosphate의 제거를 촉매하여, 단백질의 비인산화 상태를 이룬다.

곤충에서도 제2차전달계(second messenger system)에 관한 연구가 시작되고 있는데, *Manduca sexta*의 전흉선에서, PKA는 ecdysteroid 합성의 PTTH 조절에 중재 작용을 한다(Rountree *et al.*, 1987). 또한, PKA는 *Manduca sexta*의 뇌에서 neurotransmitter 경로를 조절하는 역할을 한다(Combest *et al.*, 1988).

cAMP-dependent phosphorylation에 수반되는 효소의 역학적인 특성의 변화도 일부 곤충에서 연구된 바 있다(Glass and Krebs, 1980). 곤충에서 단일효소 또는 단백질이 cyclic nucleotide-dependent protein kinase의 내생기질로 동정된 것은 아니지만, 곤충의 PKA의 동정과 특성을 밝히는데 있어서 점진적인 진전이 이루어지고 있다.

휴면과 비휴면 곤충에 있어서 두드러진 차이점은 cAMP 농도의 증가가 휴면 개시에 작용하는 것으로, *Sarcophaga crassipalpis*의 휴면 개시에도 관여하는데, 번데기 휴면에 진입된 유충은 비휴면 유충보다 cAMP 농도가 2-3배 더 낮다고 보고되었다(Denlinger, 1979). 또한 PKA의 활성도는 *Bombyx mori*의 배 발생 중기, 5령유충의 지방체에서 높게 나타난다고 하였다(Takahashi, 1976).

척추동물의 PKA 내생기질은 글리코젠 가인산가수분해효소(glycogen phosphorylase)와 글리코젠 합성효소(glycogen synthetase)로 보고되었다(Sodering *et al.*, 1970). *Bombyx mori*의 번데기에서 정제된 PKA는 토끼의 골격근 glycogen phosphorylase kinase와 글리코젠 합성효소를 인산화 할 수 있으며, 각 효소의

활성화와 비활성화를 가져 온다(Nishiyama *et al.*, 1975).

최근에 Bishoff등(1990)은 제1차 전달체인 호르몬이 세포막의 수용체에 부착되어 adenylate cyclase의 활성이 자극되어 세포질내 cAMP의 농도가 높아지면 PKA의 활성도를 증가시킨다고 하였다. Wang 등(1990)은 forskolin(FORSK), octopamine(OA), 그리고 adipokinetic 호르몬(AKH)등이 *Locusta migratoria*의 지방체에서 diacylglycerol(DG)의 생성을 자극하여 혈림프로 방출시키며, 지방체에서 cAMP 농도를 증가시키지만 cAMP와 diacylglycerol 생성이 비례하지는 않는다고 하였다. 또한 Ryou 등(1993)은 *Galleria mellonella* 균질물의 cAMP 농도를 측정하여 종령에서 증가하여 번데기 4일에 최대에 도달하였다고 하였다.

밤바구미에 대한 연구로는 Shin(1987)의 혈림프 조성에 대한 연구와 Ahn(1988)의 유충호르몬과 유충호르몬에스테라제 활성에 대한 연구가 있다.

본 연구는 밤바구미(*Curculio dentipes*) 유충의 월동전-월동중-월동후의 단계에 따른 내생 cAMP 농도를 측정하고, 이에 의해서 활성을 이루는 PKA의 활성도를 측정하여, 이들의 생리적 특성을 밝히려 한다.

## 재료 및 방법

### 실험곤충

cAMP의 농도와 PKA의 활성도를 측정하기 위하여 밤바구미(*Curculio dentipes*) 유충을 야외사육장에서 자연상태로 92년 10월부터 93년 5월까지 사육하였다. 재료를 비월동유충(온도  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광주기 11:13 LD), 월동유충(온도  $-3 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광주기 10:14 LD), 월동후유충(온도  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광주기 12:12 LD)으로 구분하여 암수 구별없이 사용하였다.

### 시약

본 실험에 사용한 시약은  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ,

sodium glycerol phosphate, magnesium acetate, EDTA, sodium hydroxide, potassium phosphate, trichloroacetic acid, ammonium sulfate, calcium phosphate gel, cAMP, ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA), perchloric acid, sodium acetate, histone type II, BSA, theophylline, sodium fluoride 등으로 동위원소는 Amersham 제품을 구입하였고, 기타 제품은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

#### 총단백질 정량

밤바구미 유충의 발육 단계에 따라 단백질 정량은 Lowry 등(1951)법을 변형하여 측정하였는데, 효소 정제 단계에서 추출된 각 상층액을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다가 사용하였다.

0.01% bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 흡광도를 측정한 후 표준곡선과 비교하여 함량을 계산하였다. 흡광도 측정은 spectrophotometer(UV-120-02 Shimadzu, Japan)를 이용하여 750 nm에서 실시 하였다.

#### 효소정제

Cyclic AMP-dependent protein kinase의 활성도를 측정하기 위한 효소의 정제는 Takahashi와 Hanaoka(1977) 방법을 변형하여 4단계로 나누어 추출하였다. 효소정제에 이용된 모든 방법은  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 수행하였다.

##### ① Preparation of crude extract

동결 보관해둔 재료를 각 시기별로 10 g씩 평량하여 중성의 4 mM EDTA 용액 3 ml로 균질화하였다. 균질물은 냉온 상태에서 30분간 27,000 g로 원심분리하여 상층액을 얻었다.

##### ② Acid Precipitation

상층액을 1 N acetic acid를 이용하여 한방울씩 떨어뜨리면서 pH를 4.8로 되도록 저어주며 조정하였다. 이때 생성된 침전물을 30분간 27,000 g로 원심분리하여 제거하였다. 상층액을

1 M potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 다시 pH 6.5로 조정하였다.

##### ③ Ammonium sulfate fractionation

Solid ammonium sulfate를 acid precipitation에서 얻은 최종 용액에 첨가하였다. 첨가한 후 20분 동안 16,000 g로 원심분리하여 얻은 침전물을 6% crude extraction volume이 되도록 5mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하였다. 이때 얻은 용액을 동일한 buffer로 투석하였다. 투석 후, 이 용액을 30분 동안 27,000 g로 원심분리하여 상층액을 취하였다.

##### ④ Calcium phosphate gel treatment

사용된 calcium phosphate gel의 양은 protein g당 2-2.5g(dry weight)으로 하였다. 이때 침전물은 10분 동안 3,300 g로 원심분리하여 얻고, 얻어진 침전물은 0.03 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 재현탁 한 다음 다시 원심분리하여 pellet을 모았다. 효소활성도는 0.3 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 gel에서 용출하는데, 용출은 3,300 g로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 모아서 5mM potassium phosphate buffer(pH 6.5)로 투석하였다.

#### cAMP의 농도 측정

밤바구미 유충의 발육 단계에 따라 cAMP의 농도 측정은 Krstulovic 등(1979)의 방법을 변형하여 실시하였다.

cAMP의 추출은 각 시기별로 재료를 1 g씩 평량하여 6% perchloric acid로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 균질화한 후, 원심분리(3,000 g, 10 min)하여 얻은 상층액을 Acro LC13 filter(Gelman Sci Co.)로 여과하여 동결건조기(Labconco, U.S.A.)로 농축하였다. 이 농축액을 6% perchloric acid로 재용해한 후, millipore filter(Syrfil-MF, Costar corp.)로 2차 여과하여 HPLC(Waters 510, Spectra-Physics)용 시료로 사용하였다. 분석은  $\text{C}_{18}$ (5  $\mu$ ,  $4.6 \times 150$

mm) column으로 254 nm에서 용매 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : methanol(88: 12, v/v)을 이용하여 flow rate 0.4 ml/min로 수행하였다.

cAMP의 농도측정은 standard와 시료의 retention time을 비교하고 각각의 peak area를 standard peak area와 비교 계산하였다.

#### Cyclic AMP-dependent protein kinase의 활성도 측정

Cyclic AMP-dependent protein kinase의 활성도는 Takahashi와 Hanaoka(1977) 방법을 변형하여 측정하였다.

정제된 효소 50  $\mu\text{l}$ 을 standard assay incubation mixture(sodium glycerol phosphate buffer, pH 6.0; histone, 0.04 mg; cAMP, 5  $\mu\text{mole}$ ;  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ( $1 \times 10^6$  cpm), 1 nmole; magnesium acetate, 5 mmole; sodium fluoride, 2  $\mu\text{mole}$ ; EGTA, 0.06  $\mu\text{mole}$ ; theophylline, 0.4  $\mu\text{mole}$ )에 넣고, shaking water bath(30°C)에서 5분간 incubation 한다. 그 후, 7.5% TCA를 4 ml 첨가하여 반응을 중지시키고 동시에 0.63% BSA를 0.2 ml첨가한 다음, 0°C에 5분간 방치하고, 18,000 g로 원심분리하여 상층액은 버렸다. 상층액을 제거하고 남은 침전물에 1N NaOH 0.1 ml을 넣어 용해하고 5% TCA 2 ml를 첨가하여 단백질을 다시 침전시킨다. 이러한 과정을 2회 반복 세척하여 얻은 침전물을 다시 1N NaOH 0.1 ml에 녹이고 방사능계측기(liquid scintillation counter; LKB 1217 Rackbeta, Finland)를 이용하여 protein-bound 방사능을 측정하였다. 효소활성도의 one unit는 standard assay system에서 30°C 5분간  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 에서 회수된 단백질로 전이된 1 pmole의 효소의 양으로 규정하였다.

#### 결과

밤바구미(*Curculio dentipes*) 유충의 월동 전-월동중-월동후의 발육단계에 따라 cyclic

adenosine-3',5'-monophosphate(cAMP)와 cAMP-dependent protein kinase(PKA)를 추출 분리하여 농도와 활성도를 측정하고 이들의 생리적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

#### cAMP의 농도 변화

밤바구미의 월동전유충, 월동중유충과 월동후 유충의 발육 단계에 따라 균질물을 원심분리하여 얻은 조직추출액에서의 cAMP의 농도변화를 HPLC를 이용하여 얻은 결과는 Table 1과 같다.

cAMP standard의 retention time은 25분 경으로 나타났으므로(Fig. 1), 시료를 분리한 결과(Fig. 2)를 이와 비교하여 정량하였다.

cAMP의 농도는 월동전유충에서 0.57  $\mu\text{M/g}$ 으로 최고치를 나타냈고, 월동중 유충에서 감소하여 최저치를 나타냈고(0.14  $\mu\text{M/g}$ ), 월동후 유충(0.29  $\mu\text{M/g}$ )에서 다시 상승하였다.

#### Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA)의 활성도 변화

##### 1) 효소 정제 단계에 따른 PKA의 활성도 변화

밤바구미 유충의 월동에 따른 발육 시기별 효소 정제 단계에 따른 PKA의 활성도를 측정한 결과는 Table 2-4와 같다.

PKA의 활성도는 효소 정제 단계를 지남에 따라 증가하였고, 총단백질 함량은 단계에 따라 감

**Table 1.** Concentration of cyclic AMP and the activity of cAMP-dependent protein kinase from different larval stages of the chestnut weevil, *Curculio dentipes*

	Stages		
	A	B	C
cAMP conc. ( $\mu\text{M/g}$ )	0.57	0.14	0.29
PKA activity (unit/mg)	2.56	0.62	2.07

\*cAMP concentration data was obtained from HPLC used in homogenate.

\*The source of the PKA activity was the calcium phosphate gel fraction from purification steps.

A: Non-overwintering larvae B: Wintering larvae C: Overwintering larvae

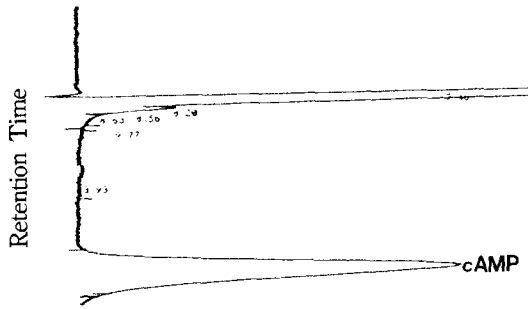


Fig. 1. Standard peak of cyclic AMP

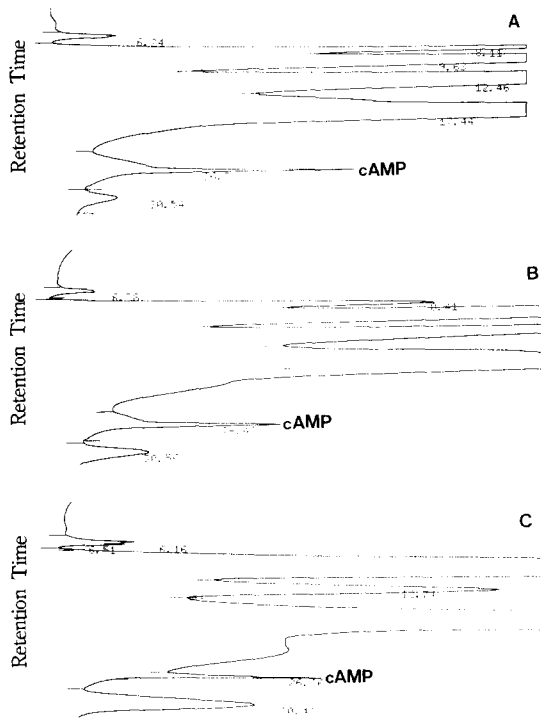


Fig. 2. Chromatogram of cyclic AMP from larval stages of the chestnut weevil, *Curculio dentipes*. A: Non-overwintering larvae B: Wintering larvae C: Overwintering larvae

소하였다.

2) PKA의 활성화 변화

밤바구미 유충의 월동으로 인한 휴면에 따른 발육 시기별 calcium phosphate gel eluate를 이용하여 측정된 PKA의 활성화도의 결과는

Table 1과 같다.

PKA 활성화도는 월동전에 2.56 unit/mg로 가장 높았으며, 월동중에 0.62 unit/mg로 감소하다가 월동후에 2.07 unit/mg로 다시 증가하여 cAMP 농도 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 단백질의 인산화에 의한 PKA의 활성화도는 외생 cAMP 첨가시 증가하고 내생 cAMP 농도 변화와 PKA 활성화도 변화가 유사한 경향을 나타냈다.

고찰

곤충류는 변태기간중 그 생활환에 따라 복잡한 형태변화와 더불어 생리적인 변화를 수반한다. 곤충의 혈림프 내 화학적 조성을 이루는 단백질, 탄수화물, 지질, 호르몬, 효소 등의 유기물질은 발생과 변태에 따라 변화가 일어나는데 이러한 양상은 취식상태, 환경요인 등에 따라 많은 변이를 보인다. 특히 생활환(Kato, 1935)이 복잡한 밤바구미에서는 더욱 특이한 변이를 나타냈다.

곤충의 혈림프 단백질은 곤충의 내부 환경요인으로서 세포와 조직의 보수, 성장유지 및 탄수화물과 호르몬 대사를 위한 기본물질이며, 대부분 효소의 주성분이기도하여, 그 생리적 기능은 다양하다(De Bianchi and Terra, 1976).

밤바구미의 단백질 함량은 월동전 유충에서 최고에 달했으며 월동 중 급격히 감소하였다가 월동후 유충에서 다시 상승하는 변화를 나타냈다. 이러한 변화는 월동전 유충이 휴면에 들어가기전에 광주율, 온도등의 환경요인에 의해 신진대사에 변화를 일으켜 지질을 축적하고, 월동에 대비한 저온내동성물질을 생성하여 함량이 증가된 것으로 생각된다(Yoo et al., 1990). 또 월동중 유충은 이미 휴면상태에 들어가는 것으로 월동중 대사속도와 체내활성이 급격히 감소하여 단백질 함량이 감소되었고, 월동후 유충에서 단백질 함량이 증가된 것은 대사속도와 내분비계가 활성화되고 표피층에서 단백질과 핵산의 합성으로 저온 내동성물질이 소멸된 때문으로 생각된다.

**Table 2.** Partial purification of cyclic AMP-dependent protein kinases from non-overwintering larvae of the chestnut weevil, *Curculio dentipes*

Fractions	Total Volume (ml)	Total activity (unit)		Specific activity (unit/mg)		Total Protein (mg)	Purification fold
		No add	cAMP	No add	cAMP		
Crude extract	29.00	807.34	1280.49	0.15	0.24	5232.00	1.00
pH 4.8 supernatant	32.00	799.43	1557.55	0.17	0.33	4674.00	1.36
Ammonium sulfate precipitate	25.00	523.96	1134.34	0.47	1.02	1116.00	4.16
Calcium phosphate gel eluate	10.00	518.76	963.48	1.38	2.56	376.00	10.50

\*One unit of activity is that the amount of enzyme which transfers 1 pmoles of  $^{32}\text{P}$  from ( $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ )ATP to substrate protein.

\*Assays were done in the presence and the absence of  $5\ \mu\text{M}$  cAMP.

\*Unit  $\times 10^{-7}$

**Table 3.** Partial purification of cyclic AMP-dependent protein kinases from wintering larvae of the chestnut weevil, *Curculio dentipes*

Fractions	Total Volume (ml)	Total activity (unit)		Specific activity (unit/mg)		Total Protein (mg)	Purification fold
		No add	cAMP	No add	cAMP		
Crude extract	30.00	256.99	336.41	0.07	0.10	3485.80	1.00
pH 4.8 supernatant	30.00	438.55	547.01	0.13	0.17	3206.40	1.77
Ammonium sulfate precipitate	22.50	243.20	452.35	0.20	0.38	1190.00	3.94
Calcium phosphate gel eluate	10.00	123.85	251.41	0.30	0.62	408.00	6.38

See Table 1 legend for further explanation.

cAMP는 일부 세포의 생리적 기작에 관여하며(Berridge and Prince, 1972), 대부분 polypeptide 호르몬의 제2차전달자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 곤충에서 이러한 유형으로 조절되는 몇몇 신경호르몬은 전흉선자극호르몬(prothoracicotropic hormone; Vedeckis *et al.*, 1976), bursicon (Vanderberg and Mills, 1974), 위용각경화 factor(puparium tanning factor; Fraenkel *et al.*, 1977), eclosion 호르몬(Truman *et al.*, 1976), diuretic 호르몬(Aston, 1975)과 hyperglycemic factor(Hanaoka and Takahashi,

1977) 등이 있다.

Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP)의 효과는 내생 단백질을 인산화하는 cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA)의 활성을 통하여 중재된다. 인산화된 단백질은 호르몬이나 신경전달물질의 생물학적 반응에 효과가 있다(Rubin *et al.*, 1972).

본 실험에서 내생 단백질을 인산화하는 PKA의 활성도는 증가하였으나, 총단백질 함량은 감소되어 효과적인 정제가 이루어진 것으로 볼 수 있다. 이때 총단백질 함량의 감소와 PKA의 활성도가 증가한 것은 PKA 활성 저해물질이 정제

**Table 4.** Partial purification of cyclic AMP-dependent protein kinases from over-wintering larvae of the chestnut weevil, *Curculio dentipes*

Fractions	Total Volume (ml)	Total activity (unit)		Specific activity (unit/mg)		Total Protein (mg)	Purification fold
		No add	cAMP	No add	cAMP		
Crude extract	30.00	748.33	1004.64	0.15	0.20	5040.00	1.00
pH 4.8 supernatant	30.00	1176.84	1234.73	0.26	0.27	4578.00	1.36
Ammonium sulfate precipitate	20.00	1088.70	2053.41	0.92	1.73	1188.00	8.67
Calcium phosphate gel eluate	10.00	536.46	688.28	1.62	2.07	332.00	10.40

See Table 1 legend for further explanation.

단계에 따라 제거된 것으로 보였다.

휴면과 관련된 연구에서 cAMP는 *Hyalophora cecropia*의 번데기 휴면 종결에 작용하지만 (Rasenick *et al.*, 1976), *Hyalophora gloverii* (Vedeckis and Gilbert, 1973)와 *Mamestra configurata*의 성충 발생 개시에는 효과가 없었다고 하였다 (Bodnaryk, 1975). 또한 *Manduca sexta* 번데기에서 휴면중에 PKA의 뚜렷한 감소가 일어나며, 이러한 감소는 휴면과 비휴면 번데기로부터 전홍선의 단백질 조성에서 나타나는 차이점이라고 하였다 (Smith *et al.*, 1987). 이것은 PKA가 PTTH에 대한 세포내 반응의 유지에 필수적인 요소인 것으로 생각된다.

휴면과 비휴면 곤충에 있어서 두드러진 차이점은 cAMP 농도의 증가가 휴면 개시에 작용하는 것으로, *Sarcophaga crassipalpis*의 휴면 개시에서 보고되었는데, 번데기 휴면이 결정된 유충은 비휴면 유충보다 cAMP 농도가 2-3배 더 낮았다 (Denlinger, 1979).

cAMP의 농도는 glucose 대사에 의해 간접적으로 조절되는데, 박테리아의 경우, glucose가 들어 있는 배지에서는 세포내의 cAMP 농도가 매우 낮아지는 반면, 해당과정에서 분해될 수 없는 탄소원이나 글리세롤이 들어 있는 배지에서는 cAMP의 농도가 높아진다. Shin (1987)에 의하면 *Curculio dentipes* 유충의 월동에 따른 휴

면으로 glycerol의 함량이 월동전에 높았다가 월동중에 감소하고 월동후 다시 상승하였다고 하였다. 따라서 본 실험에서의 cAMP의 농도 변화와 유사한 경향을 나타냈다. 이는 휴면 번데기에서 해당과정이 저온에 의해 자극을 받은 결과 trehalose 보다 glycerol을 월동을 위한 항동결제로 형성한다는 보고와 잘 일치한다 (Wyatt, 1974).

모든 동물에서 glycogen 이용 조절 중심은 불활성 phosphorylase kinase를 활성형으로 전환시키고 phosphoprotein phosphatase에 의해서 비활성형으로 되돌려 보낸다. 이것에 상대적으로 특이한 protein kinase의 활성형을 inactive glycogen phosphorylase b, 또는 active glycogen phosphorylase a의 전환을 촉매한다. cAMP-dependent protein kinase의 작용으로 척추동물에서 phosphorylase kinase의 활성화를 이룬다 (Walsh and Krebs, 1973). cAMP-dependent와 cAMP-independent mechanisms도 곤충에서 glycogen 이용에 관여하며, 척추동물에서의 경우와 유사한 것도 있다. Trehalagon은 지방체 phosphorylase를 활성화하며 지방체 glycogen의 소모의 원인이다 (Steele, 1963). Hormone-induced glycogenolysis는 곤충의 주요 탄수화물인 trehalose의 농도를 증가시킨다. 그러나 호르몬에 의한 cAMP 농도의 증가가 trehalose

농도 증가에 앞서 일어난다(Hanaoka and Takahashi, 1977).

월동에 따른 유충이 월동전에 단백질합량과 glycerol 함량 그리고 그에따른 cAMP 농도가 높았고, cAMP에 의해 활성을 이루는 PKA 또한 가장 높은 활성도를 나타낸 후, 월동중에 감소하고 월동 후 다시 PKA 활성도가 증가하여 세포내 유기물질의 변화가 유사한 경향을 나타냈다(Yoo et al., 1990).

이는 월동전에 휴면에 대비하여 최대의 취식으로 다량의 지방체 축적이 이루어져 cAMP 농도가 최고치를 나타냈고, 월동중에는 체내 항상성 유지를 위하여 지방체의 소비가 증대되기 때문에 감소하였다가 월동후 휴면 종결과 유충-번데기 탈피를 준비하기 위해 cAMP와 PKA가 증가된 것으로 생각된다.

PKA는 cAMP linking membrane-bound의 수용체로 작용하며, hormone-sensitive adenylyl cyclase system과 연계되어 세포의 생리적 반응을 나타낸다. Protein kinase는 특히 serine과 threonine 잔기에 ATP의 phosphate의 전이를 촉매함으로써 특이한 세포내 단백질의 활성을 전환한다. 또한 protein kinase는 glycogen과 지질의 대사, 단백질 합성, DNA 전사 등으로 cAMP의 세포내 농도를 변화시킨다(Rubin et al., 1972).

이상의 사실들로 미루어 보아 밤바구미의 유기물질은 독특한 변화 양상을 나타내는데, 즉 휴면 월동에 따른 특이한 생리적 변화 패턴을 나타냈다. 본 실험에서 월동초기에는 월동후 유충시기에 축적된 각 유기물질이 전반적으로 감소현상을 나타내는데, 이는 저온 및 휴면 상태로 인해 저하된 물질대사와 월동에너지로서의 소모에 기인된 것으로 생각된다. 이에따라 cAMP 농도변화도 유사한 경향을 나타내었고, cAMP에 의해 활성화되는 PKA 활성도 또한 같은 경향을 나타내어 밤바구미의 이러한 온도 광주율에 따른 생리적 변화가 휴면 월동에 기인하는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Ahn, K.H., B.S. Shin, J.J. Lee and K.R. Lee, 1988. Juvenile hormone titer and juvenile hormone esterase activities in the chestnut weevil, *Curculio dentipes*. *Korean J. Ent.* **18(3)**: 177-190.
- Aston, R.J., 1975. The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in relation to the diuretic hormone of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* **21**: 1873-1877.
- Beavo, J.A., P.J. Bechtel and E.G. Krebs, 1975. Mechanisms of control for cyclic AMP-dependent kinase from skeletal muscle. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **5**: 241-251.
- Beebe, S.D. and Corbin, J.D., 1986. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. In *The Enzymes* (Edited by Boyer, P.D. and Krebs, E.G.). Academic Press, New York. Vol. 18, pp.43-111.
- Berrige, M.J. and W.T. Prince, 1972. The role of cyclic AMP and calcium in hormone action. *Adv. Insect Physiol.* **9**: 1-49.
- Bishoff, S.T., W.L. Combest and L.I. Gilbert, 1990. Characterization of cAMP-dependent protein kinase from the pupal wing epidermis of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **20**: 397-404.
- Bodnaryk, R.P., 1983. Cyclic nucleotides. In *Endocrinology of Insects* (Edited by Downer R.G.H. and Laufer H.), Liss, New York. pp.567-614.
- Bodnaryk, R.P., 1975. Interaction of cyclic nucleotides and ecdysterone in breaking the pupal diapause of the Bertha armyworm, *Mamestra configurata*. *Life Sci.* **16**: 1411-1416.
- Combest, W.L., T.J. Bloom and L.I. Gilbert, 1988. Polyamines differentially inhibit cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation in the brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Neurochem.* **51**: 1581-1591.
- De Bianchi, A.G. and W.R. Terra, 1976. Hemolymph protein patterns during the spinning stage and metamorphosis of *Rhynchosciara americana*. *J. Insect Physiol.* **22**: 535-540.
- Denlinger, D.L., 1979. The physiology of pupal diapause in flesh flies. In *Current Topics in Insect Endocrinology and Nutrition*. Edited by G. Bhaskaran, S. Friedman and J.G. Rodriguez. Plenum Press, New York. PP. 131-160.
- Fraenkel, G., A. Blechl, J. Blechl, P. Herman and M. I. Seligman, 1977. 3',5'-cyclic AMP and hormonal control of puparium formation in the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 2182-2186.
- Gade, G., 1979. Studies on the influence of synthetic



- adipokinetic hormone and some analogs on cyclic AMP levels in different arthropod systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**: 122-130.
- Glass, D.B. and E.G. Krebs, 1980. Protein phosphorylation catalysed by cyclic AMP-dependent and cyclic GMP-dependent protein kinases. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* **20**: 363-388.
- Greengard, P., 1976. Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature (Lond)*. **260**: 101-108.
- Hanaoka, K. and S.Y. Takahashi, 1978. Endocrine control of carbohydrate metabolism including the mechanism of action of the hyperglycemic hormone in insects. In Gaillard P.J., Boer H.H(EDs): "Comparative Endocrinology." Amsterdam: Elsevier/North-Holland. pp.455-458.
- Hanaoka, K. and S.Y. Takahashi, 1977. Adenylate cyclase system and the hyperglycemic factor in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **7**: 95-99.
- Kato, M., 1935. On the chestnut weevil, *Curculio dentipes* especially on the larval stage. *Sci. Rep., Tokoku Imp. Univ., Ser. IV.* 10(15).
- Krstulovic, A.M., R.A. Hartwick and P.R. Brown, 1979. Reversed-phase liquid chromatographic separation of 3',5'-cyclic ribonucleotides. *Clin. Chem.* **25**: 235-241.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrugh, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* **193**: 265-275.
- Nishiyama, K., H. Katakami, H. Yamamura, Y. Takai, R. Shimomura and Y. Nishizuka, 1975. Functional specificity of guanosine 3',5'-monophosphate-dependent and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases from silkworm. *J. Biol. Chem.* **250**: 1297-1300.
- Rasenick, M.M., M. Neuburg and S.J. Bernt, 1976. Brain cyclic AMP levels and the initiation of adult development in the *Cecropia* silkworm. *J. Insect Physiol.* **22**: 1453-1456.
- Rountree, D.B., W.L. Combest and L.I. Gilbert, 1987. Protein phosphorylation in the prothoracic glands as a cellular model for juvenile hormone-prothoracicotropic hormone interactions. *Insect Biochem.* **17**: 943-948.
- Rubin, C.S., J. Erlichman and O.M. Rosen, 1972. Molecular forms and subunit composition of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase purified from bovine heart muscle. *J. Biol Chem.* **247(1)**: 36-44.
- Ryou, J.S., Y.K. Kim and K.R. Lee, 1993. Juvenile hormone esterase activity and cAMP concentration of the last instar larval-pupal developmental stages of the great wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Basic Sci. Kon-Kuk Univ.* **18**: 73-86.
- Shin, B.S., 1987. Studies on the hemolymph composition and juvenile hormone titer in the larval and pupal stage of the chestnut weevil, *Curculio dentipes*(Roelofs). PH.D. Thesis. Kon-Kuk Univ., Seoul, Korea.
- Smith, W.A., W.L. Combest, D.B. Rountree, and L.I. Gilbert 1987. Neuropeptide control of ecdysone biosynthesis. *Molecular Entomology*, pp. 129-139. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Sodering, T.R., J.P. Hickenbottom, E.M. Reimann, F.L. Hunkeler, D.A. Walsh and E.G. Krebs, 1970. Inactivation of glycogen synthetase and activation of phosphorylase kinase by muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **245**: 6317-6328.
- Steele, J.E., 1963. The site of action of insect hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endoc.* **3**: 46-52.
- Takahashi, S.Y. and K. Hanaoka, 1977. Multiple protein kinases in the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **7**: 133-139.
- Takahashi, S.Y., 1976. Variation of activity of cyclic nucleotide-dependent protein kinases during development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **6**: 519-523.
- Truman, J.W., A.M. Fallon and G. R. Wyatt, 1976. Hormonal release of programmed behavior in silk moths: probable mediation by cyclic AMP. *Science.* **194**: 1432-1434.
- Vanderberg, R.D. and R.R. Mills, 1974. Hormonal control of tanning by the American cockroach: cyclic AMP as a probable intermediate. *J. Insect Physiol.* **20**: 623-627.
- Vedeckis, W.V., W.E. Bollenbacher and L.I. Gilbert, 1976. Insect prothoracic glands: a role for Cyclic AMP in the stimulation of  $\alpha$ -ecdysone secretion. *Molec. Cell. Endocr.* **5**: 81-88.
- Vedeckis, W.V. and L.I. Gilbert, 1973. Production of cyclic AMP and adenosine by the brain and prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **19**: 2445-2457.
- Walsh, D.A., 1978. Role of the cAMP-dependent protein kinase as the transducer of cAMP action. *Biochem Pharmacol.* **27**: 1801-1804.
- Walsh, D.A. and E.G. Krebs, 1973. Protein kinases. In Boyer, P.D. (Ed): "The Enzymes." New York: Academic Press. Vol.8, Part A, pp. 555-581.
- Wang, Z., Y. Hayakawa and R.G.H. Downer, 1990. Factors influencing cyclic AMP and diacylglycerol

- levels in fat body of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **20(4)**: 325-330.
- Wyatt, G.R., 1974. Regulation of protein and carbohydrate metabolism in insect fat body. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **67C**: 23-27.
- Yoo, C.M., S.E. Jeong and H.Y. Kim, 1990. Studies on the changes of organic compounds and the related enzymes of overwintering larvae in the pine needle gall midge, *Thecodiplosia japonensis*. I. On Organic Compounds. *Korean J. Ent.* **20(2)**: 91-101.
- (Accepted February 25, 1994)

---

**Concentration of cyclic AMP and Activity of cyclic AMP-dependent Protein Kinase in Chestnut Weevil, *Curculio dentipes***

Jin-Soo Ryou, Yoo-Kyung Kim, and Kyung-Ro Lee (Department of Biology, College of Sciences, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

The concentration of cyclic AMP (cAMP) of whole body and activity of cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) in partial purification were measured in chestnut weevil, *Curculio dentipes* according to the non-overwintering, wintering, and overwintering larvae. cAMP concentration and PKA activity measured by HPLC and Liquid Scintillation Counter, and investigated the correlation of cAMP and PKA.

The cAMP concentration were found to be the maximum at the non-overwintering larvae (0.57  $\mu\text{M/g}$ ) and decreased at the wintering larvae (0.14  $\mu\text{M/g}$ ). At the overwintering larvae, it was increased again (0.29  $\mu\text{M/g}$ ). Also, the activity of PKA were showed the highest level at the non-overwintering larvae (2.56 unit/mg) and decreased at the wintering larvae (0.62 unit /mg) in calcium phosphate gel purification step, wherase it increased again at overwintering larvae (2.07 unit/mg).

Therefore, cAMP concentration and PKA activity were shown to be similar aspect. This results were suggested that the accumulation of fat body in non-overwintering larvae appeared to be more closely related to largest ingestion prior to diapause and that cAMP concentration and PKA activity increased with prepare of larval-pupal ecdysis and termination of diapause in overwintering larvae, wherase cAMP and PKA level decreased with fat body degradation at wintering larvae for use of energy source.