

## 연두금파리의 발생에 따른 cyclic AMP, cyclic AMP-Dependent Protein Kinase, Ecdysteroids의 변화

김유경 · 류진수 · 이경로

건국대학교 이과대학 생물학과

연두금파리의 유충-번데기-성충의 발생에 따른 cyclic AMP(cAMP)와 ecdysteroids의 농도 및 cyclic AMP-dependent protein kinase(PKA)의 활성도를 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)와 Liquid Scintillation Counter(LSC)를 이용하여 측정하고 상관 기능 변화를 조사하였다.

cAMP의 농도와 PKA의 활성도는 중령유충 및 성충에서 낮은 값(0.29  $\mu\text{M/g}$ , 5.52~5.59 unit/mg)을 나타내었고, 번데기 0일(0.49  $\mu\text{M/g}$ , 92.22 unit/mg)과 7일(0.50  $\mu\text{M/g}$ , 24.45 unit/mg)에서 최고치를 보였으며 번데기 4일에서 최저수준(0.13  $\mu\text{M/g}$ , 3.23 unit/mg)을 나타내었다.

Ecdysone 농도는 번데기 2일에 최고치(37.84  $\mu\text{g/g}$ )를, 4일에 최저치(18.46  $\mu\text{g/g}$ )를 보인 후, 5일에 24.37  $\mu\text{g/g}$ 로 상승하였으며 성충에서는 낮은 값을 나타내었다. 그러나 20-hydroxyecdysone 농도는 번데기 4일(23.66  $\mu\text{g/g}$ )과 번데기 6일(14.90  $\mu\text{g/g}$ )에 최고치를 이루었고, 7일에서 최저치(1.21  $\mu\text{g/g}$ )를 나타내었다.

**KEY WORDS:** cAMP, PKA, ecdysteroids, *Lucilia illustris*

곤충 변태와 관련된 호르몬 작용은 세포내 전달에 따른 매개체를 필요로 하는데, 특히 cyclic adenosine 3'-5' mono-phosphate(cAMP)는 세포의 생리적 전달기작에 관여하며(Berridge and Prince, 1972), 대부분은 polypeptide성 호르몬의 제2차전달자로 작용한다(Beebe and Corbin, 1986). 곤충류에서 제2차전달계(second messenger system)에 관한 연구도 빠르게 진행되고 있으며, cAMP-dependent protein kinase(PKA)는 몇가지 호르몬적 신호의 전이작용 역할을 한다고 보고되고 있다(Smith *et al.*, 1984). *Manduca sexta*의 전흉선에서 PKA는 ecdysteroid 합성에 관여하는 PTH 조절에 중재작용을 하며(Rountree *et al.*, 1987), 또한 PKA는 *Manduca sexta*의 뇌에서 neurotransmitter 경로를 조절하는 역할을 한다(Combest *et al.*, 1988). *Manduca sexta*의 단백질 인산화에 있어서

cAMP 첨가에 의해 얻은 자극 범위는 혈림프 ecdysteroid titer의 변화와 관련이 있으며(Bishoff *et al.*, 1991). 모든 phosphoprotein의 인산화 수준은 ecdysteroid 총량 가운데 ecdysone이 20-hydroxyecdysone으로 전환된 만큼 감소된다(Warren and Gilbert, 1986). Ecdysone은 많은 곤충의 ecdysial glands에서 합성된 화합물로 잘 알려진 후, 혈림프로 방출되어 차례로 효소학적으로 활성형인 20-hydroxyecdysone으로 전환된다(Wildmann and Romer, 1977). 20-hydroxyecdysone은 *in vivo*와 *in vitro* 검정(assay)에서 ecdysone보다 더 높은 활성을 나타내고(Bergamasco and Horn, 1980), ecdysone은 활성 탈피호르몬인 20-hydroxyecdysone으로 전환되는 전구성호르몬으로 보고된 바 있다(Beydon and Lafont, 1983).

최근에 Ryou 등(1994)은 *Curculio*

*dentipes* 유충의 cAMP 농도와 PKA 활성도 변화에 대한 연구에서 단백질의 인산화에 의한 PKA의 활성도는 외생 cAMP 첨가시 증가하고, 내생 cAMP 농도 변화와 PKA 활성도 변화가 유사한 경향을 나타냈다고 하였다.

본 연구는 연두금파리(*Lucilia illustris*)의 유충-번데기-성충의 발생 단계에 따른 내생 cAMP 농도를 측정하고, 이에 의해서 활성화되는 PKA의 활성도를 측정하여, cAMP의 효과가 변태시의 탈피과정에 작용하여 나타나는 변화를 밝히고자 한다. 또한 cAMP가 PKA를 경유하여 중재 작용을 하는지의 여부를 밝히고, 유충의 성장, 탈피의 개시와 변태 동안의 세포분화에 관여하는 ecdysteroid류와의 기능적 상관 관계를 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험곤충

본실험에 사용한 연두금파리(*Lucilia illustris*)는 소의 간과 전지분유, 효모, parahydroxybenzoic acid, agar 등을 배합한 인공배지(Stoffolano, 1974)에서 계대 사육하였다. 온도  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 광주기 12h:12h LD, 습도 50-55% RH 조건으로 유충, 전충, 번데기 0~7일, 성충 1일 whole body를 암·수 구별없이 실험 재료로 사용하였다.

### cAMP의 농도 측정

연두금파리의 발생 단계에 따른 cAMP의 농도 측정은 Krstulovic 등(1979)의 방법을 변형하여 실시하였다.

cAMP의 추출은 각 시기별로 재료를 1g씩 평량하여 6% perchloric acid로  $4^\circ\text{C}$ 에서 균질화한 후 3,000g로 10분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 Acro LC13 filter( $0.4 \mu\text{m}$ , Gelman Sci Co.)로 여과한 다음 동결건조기(Labconco, U.S.A.)로 농축하였다. 이 농축액을 6% perchloric acid 500  $\mu\text{l}$ 로 재용해한 후 millipore filter( $0.22 \mu\text{m}$ , Syrfil-MF,

Costar corp., U.S.A.)로 2차 여과하여 HPLC(Waters 510, Waters 484, Spectra-Physics, U.S.A.)용 시료로 사용하였다. 분석은  $\text{C}_{18}$ (5  $\mu$ ,  $4.6 \times 150$  mm) column으로 254nm에서 용매 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :methanol(88:12, v/v)을 이용하여 flow rate 0.4 ml/min로 수행하였다. 감도는 0.05 AUFS 이고 주입 양은 20  $\mu\text{l}$ 를 사용하였다.

### cyclic AMP-dependent protein kinase의 활성도 측정

cyclic AMP-dependent protein kinase의 활성도는 Takahashi와 Hanaoka(1977) 방법을 변형하여 효소를 정제한 후 측정하였다.

정제된 효소 15  $\mu\text{l}$ 를 standard assay incubation mixture{sodium glycerol phosphate buffer, pH 6.0: histone, 0.04 mg;  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP( $1 \times 10^6$  cpm), 1 nmole; magnesium acetate, 5 mmole; sodium fluoride, 2  $\mu\text{mole}$ ; theophylline, 0.4  $\mu\text{mole}$ ; EGTA, 0.06  $\mu\text{mole}$ ; cAMP, 5  $\mu\text{mole}$ }에 넣고, shaking water bath에서  $30^\circ\text{C}$ 를 유지하며 5분간 배양한 후, 7.5%의 TCA를 4ml첨가하여 반응을 중지시키고 protein-bound 방사능을 측정하였다. 즉, TCA를 첨가하여 반응을 종결시킴과 동시에 0.63% BSA를 0.2 ml첨가한 다음,  $0^\circ\text{C}$ 에 5분간 방치하고, 18,000 g로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액을 제거하고 남은 침전물에 1N NaOH 0.1 ml을 넣어 용해시키고 5% TCA 2 ml를 첨가한 후, 원심분리하여 단백질을 다시 침전시켰다. 이러한 과정을 2회 반복 세척하여 얻은 침전물을 다시 1N NaOH 0.1 ml에 녹이고 방사능계측기(liquid scintillation counter: LKB 1217 Rackbeta, Finland)를 이용하여 방사능을 계측하였다. 효소활성도의 one unit는 standard assay system에서  $30^\circ\text{C}$ 로 5분동안 반응시킨 후  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP에서 회수된 단백질로 전이된 1 pmole의 효소의 양으로 규정하였다.

**Ecdysteroids의 농도 측정**

연두금파리의 발육단계에 따른 20-hydroxyecdysone과 ecdysone의 농도 측정은 Lafont 등(1982)의 방법을 변형하여 실시하였다.

각 시기별로 재료를 5 g씩 평량하여 20 ml의 추출 용매(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O = 1:1)로 4°C에서 균질화한 후, 4,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상층액에 5 ml의 H<sub>2</sub>O를 섞은 후, 5분간 방치하였다. 이 용액을 SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge에 flow rate 2 ml/min으로 peristaltic pump를 이용하여 흡착시킨 후, 25% methanol로 용출하여 극성 산물을 제거하고, 60% methanol을 이용하여 용출하였다. 이때 얻은 용액을 HPLC(Waters 510, Waters 484, Spectra-Physics, U.S.A.)용 시료로 사용하였다. 분석은 TMC<sub>18</sub>(3.9×300 mm) column으로 254 nm에서 용매 20% acetonitrile을 이용하여 flow rate 1.5 ml/min로 수행하였다. 감도는 0.02 AUFS 이고 주입 양은 20 µl를 사용하였다.

**결과**

연두금파리(*Lucilia illustris*)의 발생단계에 따른 cyclic adenosine- 3',5'-monophosphate (cAMP), cAMP-dependent protein kinase (PKA), ecdysone과 20-hydroxyecdysone을 추출 분리하여 농도와 활성도를 측정한 결과는

다음과 같다.

**cAMP의 농도 변화**

연두금파리의 종령유충, 번데기 그리고 성충의 발생 단계별 균질물을 원심분리하여 얻은 조직추출액에서 cAMP의 농도변화를 HPLC를 이용하여 얻은 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다.

cAMP의 농도는 유충기에는 0.29 µM/g으로 낮은 상태를 유지하다가, 상승하여 번데기 0일(0.49 µM/g)과 번데기 7일(0.50 µM/g)에 최고치를 나타내었으며, 번데기 0일 이후 급격히 감소하여 번데기 4일에서 0.13 µM/g으로 최저치를 보였다. 성충에서는 급격히 감소되어 0.29 µM/g을 나타내었다.

**cAMP-dependent protein kinase의 활성도 변화**

연두금파리의 유충-번데기-성충으로의 변태에 따른 발생 시기별 정제 효소를 이용하여 측정한 cAMP-dependent protein kinase(PKA)의 활성도의 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다.

PKA의 활성도는 번데기 0일과 번데기 7일에 peak를 이루었고, 번데기 0일에 92.22 unit/mg으로 가장 높은 활성도를 보였고, 번데기 7일에 24.45 unit/mg을 나타냈으며, 번데기 4일에는 가장 낮은 활성도(3.23 unit/mg)를 나타냈다.

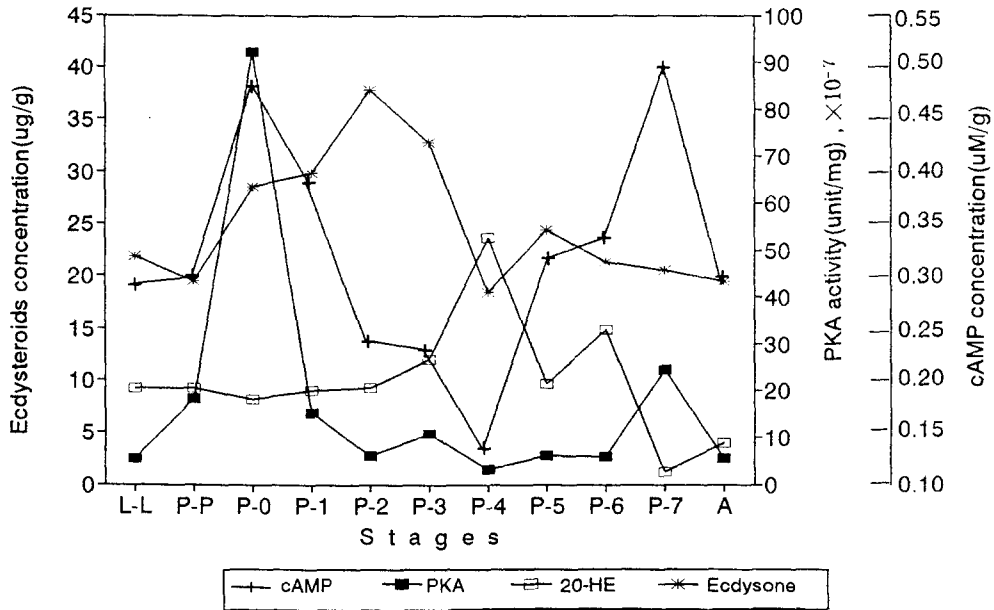
**Ecdysteroids의 농도 변화**

연두금파리의 종령유충과 번데기 그리고 성충

**Table 1.** Concentration of cAMP and activity of cAMP-dependent protein kinase during the metamorphosis of the blowfly, *Lucilia illustris*

|                        | Stages |       |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
|------------------------|--------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|                        | L-L    | P-P   | P-0   | P-1   | P-2  | P-3   | P-4  | P-5  | P-6  | P-7   | A    |
| cAMP conc. (µM/g)      | 0.29   | 0.30  | 0.49  | 0.39  | 0.24 | 0.23  | 0.13 | 0.32 | 0.34 | 0.50  | 0.29 |
| PKA activity (unit/mg) | 5.52   | 18.37 | 92.22 | 15.25 | 6.15 | 10.75 | 3.23 | 6.12 | 5.91 | 24.45 | 5.59 |

L-L: Last instar larva P-P: Prepupa P-0: Pupa 0-day P-1: Pupa 1-day P-2: Pupa 2-day P-3: Pupa 3-day P-4: Pupa 4-day P-5: Pupa 5-day P-6: Pupa 6-day P-7: Pupa 7-day A: Adult 1-day



**Fig. 1.** The concentration of cAMP, activity of cAMP-dependent protein kinase, and concentration of 20-hydroxyecdysone and ecdysone during the metamorphosis of the blowfly, *Lucilia illustris*.

L-L: Last instar larva P-P: Prepupa P-0: Pupa 0-day P-1: Pupa 1-day P-2: Pupa 2-day P-3: Pupa 3-day P-4: Pupa 4-day P-5: Pupa 5-day P-6: Pupa 6-day P-7: Pupa 7-day A: Adult

의 발생 단계별 균질물을 SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge를 이용하여 얻은 조직추출액에서 ecdysone과 20-hydroxyecdysone의 농도변화를 HPLC를 이용하여 얻은 결과는 Table 2 및 Fig. 1과 같다.

20-hydroxyecdysone 농도는 유충기에는 9.17  $\mu\text{g/g}$ 으로 낮은 상태를 유지하다가, 번데기 0일에 8.16  $\mu\text{g/g}$ 으로 감소되고, 이후 계속 상승하여 번데기 4일에 23.66  $\mu\text{g/g}$ 으로 최고치를 나타내었으며, 번데기 6일에 14.90  $\mu\text{g/g}$ 으로 두번째 peak를 이루고, 이후 감소하여 번데기 7일에서 1.21  $\mu\text{g/g}$ 으로 최저치를 보였다. 성충에서는 약간 증가하여 3.99  $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었다.

또한 ecdysone 농도는 유충기에는 21.88  $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었고, 번데기 0일에서부터 상승하여 번데기 2일에 37.84  $\mu\text{g/g}$ 로 최고치를 나타내었으며, 이후 급격히 감소하여 번데기 4일에 18.46  $\mu\text{g/g}$ 으로 최저치를 보였다. 번데기 5일에 24.37  $\mu\text{g/g}$ 로 상승하였다가 점차로 감소하여 성충에서는 19.50  $\mu\text{g/g}$ 의 낮은 농도를 나타

내었다.

연두금파리의 발생과정에서 20-hydroxyecdysone과 ecdysone의 농도는 상호 역관계를 나타냈다.

## 고찰

cAMP의 제2차 전달체계는 모든 동물계에서 대사와 발생 변화에 관여하는 호르몬 신호를 전달하는 작용을 하며, 또한 cAMP 대사에 몇몇 효소가 관여하여 발생과정 동안 뚜렷한 변화를 보인다(Castillon *et al.*, 1973; Morishima, 1973). Sutherland 등(1968)은 cAMP가 호르몬 반응을 조절하는데 관여하며, 호르몬은 표적세포에서 cAMP 농도의 증가를 일으킬 수 있으며, cAMP 또는 일부 cAMP 유도체가 호르몬 반응과 유사한 효과를 낸다고 하였다. De Reggi와 Callia(1975)는 cAMP의 뚜렷한 변화가 *Drosophila melanogaster*의 변태 동안 일

**Table 2.** Concentrations of 20-hydroxyecdysone and ecdysone during the metamorphosis of the blowfly, *Lucilia illustris*

|                                 | Stages |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                 | L-L    | P-P   | P-0   | P-1   | P-2   | P-3   | P-4   | P-5   | P-6   | P-7   | A     |
| 20-HE<br>( $\mu\text{g/g}$ )    | 9.17   | 9.23  | 8.16  | 9.02  | 9.26  | 11.97 | 23.66 | 9.68  | 14.90 | 1.21  | 3.99  |
| Ecdysone<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 21.88  | 19.50 | 28.53 | 29.85 | 37.84 | 32.80 | 18.46 | 24.37 | 21.34 | 20.53 | 19.50 |

L-L: Last instar larva P-P: Prepupa P-0: Pupa 0-day P-1: Pupa 1-day P-2: Pupa 2-day P-3: Pupa 3-day P-4: Pupa 4-day P-5: Pupa 5-day P-6: Pupa 6-day P-7: Pupa 7-day A: Adult 1-day

어난다고 하였다. Achuazi 등(1977)은 *Locusta migratoria*에서 cAMP 농도와 cyclic nucleotide-dependent protein kinase 활성도는 성충에서 감소한다고 하였으며, De Reggi 와 Cailla(1974)는 *Drosophila melanogaster*의 유충의 cAMP 농도는 탈피시 급격한 증가가 나타난다고 하였고, 또한 Takahashi(1976)는 *Bombyx mori*에서 유충-번데기와 번데기-성충 탈피에서 PKA의 활성도가 증가한다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 연두금파리의 유충-번데기 및 번데기-성충 변태시에 cAMP 농도와 PKA 활성도가 증가하고 성충에서 다시 감소하여 이와 잘 일치하였다. 이는 cAMP 체계가 탈피를 통하여 탈피전에 잠시 동안 최대에 도달하여 cAMP 농도를 일정하게 유지하도록 하여 특정 단백질이 nucleotide에 결합하여 이루어지는 현상으로 생각되며, cAMP에 의한 protein kinase의 자극이 cAMP 농도변화와 유사한 경향을 나타냄을 알 수 있다.

*Manduca sexta*에서 pharate adult 발생 7일에 혈림프에서 탈피 호르몬의 수준이 peak에 도달하는 때에 ecdysone과 20-hydroxyecdysone의 비율은 3.3:1로 나타나며 (Bollenbacher et al., 1981), 또한 *Bombyx mori*, *Heliothis zea*와 *Pieris brassicae*의 번데기에서 ecdysone이 20-hydroxyecdysone 보다 더 높은 농도로 존재한다 (Calvez et al., 1976; Holman and Meola, 1978; Lafont et al., 1975, 1977). Samuels

와 Reynolds(1993)는 *Manduca sexta*의 탈피과정이 steroid 호르몬인 20-hydroxyecdysone에 의해 조절된다고 하였는 바, ecdysteroid는 곤충 변태와 탈피에 일차적으로 반응하는 steroid 호르몬이다(Whisenton et al., 1989).

이는 본 실험에서도 20-hydroxyecdysone 보다 ecdysone이 유충, 번데기, 성충 시기 모두에서 전반적으로 더 높은 농도를 나타내어 이와 잘 일치하였다. 또한 20-hydroxyecdysone과 ecdysone의 농도 변화는 상호 역관계를 나타내며, 번데기에서 ecdysteroid의 생산 감소는 20-hydroxyecdysone의 증가와 일치하였다. 이는 전홍선에서 생성되는 ecdysone이 20-hydroxyecdysone으로 전환되어 탈피 기능에 효과를 나타내는 것으로 보이며, 따라서 전홍선에 의해 생성되는 ecdysone은 feedback regulator로서 ecdysteroid류 생성에 작용하는 20-hydroxyecdysone으로 전환되기 전에 앞서 점차로 축적되는 현상과 관련이 있다. 이는 탈피호르몬인 20-hydroxyecdysone이 ecdysteroid 생성을 저해할 수 있음을 나타내는 것이다(Beydon and Lafont, 1983).

곤충 조직에서 cAMP의 농도 변화는 종에 따라 다양하게 나타난다. *Manduca sexta*의 뇌 (Applebaum and Gilbert, 1972)와 *Drosophila hydei*의 타액선에서는 adenylate cyclase가 20-hydroxyecdysone에 의해서 자극되나(Leenders et al., 1970), *Gromphadurina portentosa*의 뇌에서는 저해된다

(Rojakovick and March, 1972). 그리고 20-hydroxyecdysone이 *Drosophila melanogaster*의 imaginal discs(Yund, 1979)와 *Manduca sexta*의 전흉선에서는 adenylate cyclase의 활성이 비효과적이었다(Vedeckis and Gilbert, 1973). 그러나 Vedeckis 등(1974)은 *Manduca sexta*의 전흉선에서 cAMP가 합성되며, cAMP를 분해하는 phosphodiesterase가 저해될 때, 전흉선이 활성화되면 cAMP 농도가 증가하고, 전흉선이 불활성화되면 증가되지 않는다고 하였다. 또한 배양 전흉선에 cAMP를 투여할 때 ecdysone의 분비가 자극되고, 전흉선에 PTTH를 투여했을 때는 cAMP의 농도가 증가하였는데 이는 PTTH가 제2차전달자로서 작용하기 때문이라고 하였다.

본 실험에서도 cAMP 농도와 PKA 활성도가 번데기 초기와 후기에 높고, 번데기 중기에 낮게 나타났으며, ecdysone도 번데기 초기와 후기에 peak를 이루고 번데기 중기에 최저를 나타내어, 유사한 변화상을 나타내었다. 그러나, 20-hydroxyecdysone은 번데기 중기에 높게 나타나 서로 상관 관계가 없음을 알 수 있다. 이는 PTTH에 의해서 전흉선이 활성화되어 cAMP의 농도를 증가시키고, PKA를 활성화하여, ecdysone의 생성을 자극하며, ecdysone이 20-hydroxyecdysone으로 전환되어 탈피호르몬으로 작용하는 것으로 생각된다. 따라서 cAMP와 PKA가 탈피와 번데에 관여하지만, 탈피호르몬인 20-hydroxyecdysone과 cyclic nucleotide는 서로 독립적으로 작용하고, cAMP가 ecdysone 생성에 영향을 미쳐 간접적으로 20-hydroxyecdysone에 작용하는 것으로 생각된다.

곤충에 있어서 발생, 성장, 번데가 몇 종류의 호르몬으로 조절되는데 이때 cAMP가 곤충 번데호르몬의 작용에서 중간 기능 물질로 중요시되며, 곤충호르몬 중 성장과 탈피에 관여하는 ecdysone, 20-hydroxyecdysone의 영향이 가장 크게 미치는 것 같다. 이는 연두금파리의 번데과정 동안 cAMP의 변화가 매우 뚜렷하게 일어나며, cAMP가 화학적 신호로서 발생단계 동

안 PKA의 뚜렷한 변화를 나타내어 이들 kinase가 번데관련 호르몬적 조절하에 있음을 시사한다.

## 참고문헌

- Achuazi, R.K., R. Haakshorst, H. Volmer and B. Surholt, 1977. The 3',5'-adenosine monophosphate system during the larval-adult moulting cycle in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **7**: 21-26.
- Applebaum, S. and L.I. Gilbert, 1972. Stimulation of adenylyl cyclase in pupal wing epidermis by  $\beta$ -ecdysone. *Dev. Biol.* **27**: 165-175.
- Beebe, S.D. and J.D. Corbin, 1986. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. In *The Enzymes* (Ed. by Boyer, P.D. and Krebs, E.G.). Vol. 18, pp.43-111. Academic Press, New York.
- Bergamasco, R. and D.H.S. Horn, 1980. The biological activities of ecdysteroids and ecdysteroid analogues. In *Progress in ecdysone research* (Ed. by Hoffmann, J. A.). **99**: 299-324. Elsevier, North-Holland. Amsterdam.
- Berrige, M.J. and W.T. Prince, 1972. The role of cyclic AMP and calcium in hormone action. *Adv. Insect Physiol.* **9**: 1-49.
- Beydon, P. and R. Lafont, 1983. Feedback inhibition of ecdysone production by 20-hydroxyecdysone in *Pieris brassicae* pupae. *J. Insect Physiol.* **29(6)**: 529-533.
- Bishoff, S.T., W.L. Combest and L.I. Gilbert, 1991. Phosphorylation of endogenous proteins by a cyclic AMP-dependent protein kinase in the wing epidermis of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **21(6)**: 665-677.
- Bollenbacher, W., S.L. Smith, W. Goodman and L.I. Gilbert, 1981. Ecdysteroid titre during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocr.* **44**: 302-306.
- Calvez, B., M. Hirn and M. de Reggi, 1976. Ecdysone changes in the hemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development. *FEBS Lett.* **71**: 57-61.
- Castillon, M.P., R.E. Catalan and A.M. Municio, 1973. Adenylyl cyclase variation during development of the insect *Ceratitis capitata*. *FEBS Lett.* **32**: 113-115.
- 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.
- Holman, G.M. and R.W. Meola, 1978. A high-performance liquid chromatography method for the purification analysis of insect ecdysones: Application to measurement of ecdysone titres during pupal-adult development of *Heliothis zea*. *Insect Biochem.* **8**: 275-278.
- 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.
- Lafont, R., B. Mauchamp, C. Blais and J.L. Penneter, 1977. Ecdysones and imaginal disc development during the last larval instar of *Pieris brassicae*. *J. Insect Physiol.* **23**: 277-283.
- Lafont, R., B. Mauchamp, J.L. Pennetier, P. Tarroux, L. De Hys and J.P. Delbecq, 1975.  $\alpha$ - and  $\beta$ -ecdysone levels in insect hemolymph: Correlation with developmental events. *Experientia.* **31**: 1241-1242.
- Lafont, R., J.L. Pennetier and M. Andrianjafintrimo, 1982. Sample processing for high performance liquid chromatography of ecdysteroids. *J. Chromatography.* **236**: 137-149.
- Leenders, H.J., G.J. Wullems and H.D. Berendes, 1970. Competitive interaction of adenosine 3',5'-monophosphate on gene activation by ecdysone. *Exp. Cell Res.* **63**: 159-164.
- Morishima, I., 1973. Cyclic AMP phosphodiesterase activity during the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **19**: 2262-2265.
- De Reggi, M.L. and H.L. Callia, 1975. Cyclic AMP levels in *Drosophila* during postembryonic development and in the adults. *J. Insect Physiol.* **21**: 1671-1674.
- De Reggi, M.L. and H.L. Callia, 1974. Physiological cyclic AMP in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **46**: 293-295.
- Rojakovick, A.S. and R.B. March, 1972. The activation and inhibition of adenyl cyclase from the brain of the madagascar cockroach (*Gromphadorhina portentosa*). *Comp. Biochem. Physiol.* **43B**: 209-215.
- Rountree, D.B., W.L. Combest and L.I. Gilbert, 1987. Protein phosphorylation in the prothoracic glands as a cellular model for juvenile hormone-prothoracicotrophic hormone interactions. *Insect Biochem.* **17**: 943-948.
- Ryou, J.S., Y.K. Kim and K.R. Lee, 1994. Concentration of cyclic AMP and activity of cyclic AMP-dependent protein kinase in chestnut weevil, *Curculio dentipes*. *Korean J. Zool.* **37**: 222-231.
- Samuels, R.I. and S.E. Reynolds, 1993. Moulting fluid enzymes of tobacco hornworm, *Manduca sexta*: Inhibitory effect of 20-hydroxyecdysone on the activity of the cuticle degrading enzyme MFP-1. *J. Insect Physiol.* **39(8)**: 633-637.
- Smith, W.A., L.I. Gilbert and W.E. Bollenbacher, 1984. The role of cyclic AMP in regulation of ecdysone synthesis. *Molec. Cell. Endocr.* **37**: 285-294.
- Stoffolano, J.G. Jr., 1974. Influence of diapause and diet on the development of the gonad and accessory reproductive glands of the black blowfly, *Phormia regina*. *Can. J. Zool.* **52**: 981-985.
- Sutherland, E.W., G.A. Robison and R.W. Butcher, 1968. Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP). *Circulation.* **37**: 279-283.
- 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.
- Vedeckis, W.V., W.E. Bollenbacher and L. I. Gilbert, 1974. Cyclic AMP as a possible mediator of prothoracic gland activation. *Zool. Jahrb. Physiol.* **78**: 440-448.
- 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.
- Warren, J.T. and L.I. Gilbert, 1986. Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **16**: 65-82.
- Whisenton, L.R., J.T. Warren, W.H. Manning and W.E. Bollenbacher, 1989. Ecdysteroid titers during pupal-adult development of *Aedes aegypti*: Basis for a sexual dimorphism in the rate of development. *J. Insect Physiol.* **35(1)**: 67-73.
- Wildmann, H. and F. Romer, 1977. Metabolism of  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -ecdysone in *Gryllus bimaculatus* during the eighth larval instar. *J. Insect Physiol.* **23**: 343-349.
- Yund, M.A., 1979. Ecdysteroid action in imaginal discs of *Drosophila melanogaster* does not involve cyclic

---

**Variations in cyclic AMP, cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Ecdysteroids during Development of the Blowfly, *Lucilia illustris***

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

To investigate the functional relationships between cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP), cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) and ecdysteroids, variations in their concentrations and activity were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Scintillation Counter (LSC) during larval-pupal-adult development of the blowfly, *Lucilia illustris*.

cAMP concentration and PKA activity showed a similar changing aspect. They were kept in low level at the last larval and adult period (0.29  $\mu\text{M/g}$ , 5.52~5.59 unit/mg), and two peaks at day-0 (0.49  $\mu\text{M/g}$ , 92.22 unit/mg) and day-7 (0.50  $\mu\text{M/g}$ , 24.45 unit/mg) and the minimum value (0.13  $\mu\text{M/g}$ , 3.23 unit/mg) at day-4 were recorded during pupal period.

The concentration of ecdysone was found to be the maximum (37.84  $\mu\text{g/g}$ ) at day-2 pupae and minimum (18.46  $\mu\text{g/g}$ ) at day-4 pupae, and it increased to 24.37  $\mu\text{g/g}$  at day-5 pupae, and then kept in low level. But 20-hydroxyecdysone were peaked at the day-4 (23.66  $\mu\text{g/g}$ ) and day-6 (14.90  $\mu\text{g/g}$ ) pupae, and it declined to the minimum (1.21  $\mu\text{g/g}$ ) at day-7 pupae.