

북방수염하늘소(*Monochamus saltuarius*) 성충의 살충제 처리에 따른 소화 효소의 활성 변화

박용철 · 조세열^{1*}

강원대학교 BT 특성화 학부 식물생명공학

¹Division of Metabolism, Endocrinology, and Diabetes, University of Michigan

(2007년 5월 3일 접수, 2007년 6월 8일 수리)

Changes in Esterase Isozyme Activity After Pesticides Treatment in Digestive Juice of *Monochamus saltuarius* (Gebler) Adult

Yong Chul Park and Saeyoull Cho^{1*} (Department of Plant Biotechnology Program, Division of Biotechnology, School of Biotechnology, Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, ¹Division of Metabolism, Endocrinology, and Diabetes, University of Michigan 1150 West Med. Center Dr. Ann Arbor MI 48109)

Abstracts : Esterase isozymes were investigated from digestive juice of *M. saltuarius* adults after pesticide treatment. Twelve esterase isozymes were separated on 12% native-PAGE gel and stained with three different substrates(α -naphthyl acetate, β -naphthyl acetate, and α -naphthyl butyrate). Interestingly, the isozyme of Est1(α -naphthyl acetate) was strongly inhibited by the carbofuran and methomyl. The Est1 activity was completely inhibited by the chlorpyrifos and partially inhibited by methidation about 70%. In addition, eserine suppressed esterase isozyme activities of Est1 about 70% and isozyme activities of Est2, Est3, and Est4 were weakly inhibited. α -pinene did not suppressed esterase isozyme activities but activities of esterases were very weakly inhibited in camphor and bornyl acetate.

Key words : *Monochamus saltuarius*, Esterase, Organophosphate, Carbamate, Terpene

서 론

곤충은 수억 년 동안 주된 먹이가 되는 식물의 유독성분에 대항하며 진화해 왔다. 우리나라에 널리 분포, 자생하는 소나무와 잣나무의 방어물질은 송진과 terpene이다. 잣나무와 소나무를 섭식하는 북방수염하늘소(*M. saltuarius*)는 기주식물의 방어물질에 대한 생리, 생화학적인 내성기작을 발달시켜왔을 것이다. 소나무류에 흔히 존재하는 오일 또는 지질의 대사와 연관성이 높은 효소 중 하나가 에스테라제이다. 북방수염하늘소(*M. saltuarius*)의 경우 또한 소화기관에 존재하는 에스테라제들이 먹이에서 유래되는 유독물질의 해독에 중요한 역할을 할 것으로 추론되지만 이에 대

한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

지금까지 농업분야에서 에스테라제에 관한 연구는 주로 곤충의 표피를 통하여 침투하는 농약을 대상으로 이루어지고 있다. 그 대표적인 예로서 카바메이트계 약제들과 유기인계 약제로서 신경세포 내에 존재하는 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE)를 저해 하는 것으로 널리 알려져 있다(Costa, 2006). 주로 신경계에서 독성을 발휘하는 이들 약제들은 소화계를 통해 에스테라제계통의 효소들을 저해하므로 독성을 발휘하기도 한다(Zhou 등, 2004). 따라서 곤충 소화계는 이들 약제의 무독화 기능을 발달 시켜 왔으며 그 중심에 에스테라제가 있다. 이러한 무독화 기능은 *Myzus persicae*, *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, *Lucilia cuprina* 등 많은 곤충에서 보고되었는데, 먹이와 함께 섭식된 유독물질(살충제 등)을 소화관내 활

* 연락저자 : Tel: +82-33-250-6436, Fax: +82-33-241-1721
E-mail: spark206@yahoo.com

성을 띠는 효소들이 가수분해 시키므로 독성 효과를 낮추는 것으로 알려져 있다(Ziegler 등, 1987; Field 등, 1988; Raftos, 1989; Raymond 등, 1989). 특히, *H. armigera*에서는 적어도 8개의 에스테라제들이 관찰되었고, 그중 E6 에스테라제가 유기인계 약제에 대한 저항성 개체군내에서 강하게 활성화 되고 있음이 보고 된바있다(Srinivas 등, 2004; Srinivas 등, 2006).

곤충의 신경계에서 약제들에 의해 유도되는 저항성 획득 또는 무독화 기전의 발달 연구결과들은 소화계의 생리체계와는 다르지만, 소화계의 효소학적 연구에 간접적인 도움을 줄 수 있으리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 신경계에서 작용기전이 알려진 화학약제를 이용하여 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충의 소화계에 존재하는 에스테라제들의 특성에 대한 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

실험곤충 및 sampling

북방수염하늘소(*M. saltuarius*)는 2006년 4월과 6월 사이에 강원도 춘천시 근교에서 북방수염하늘소(*M. saltuarius*)의 침입공이 있는 잣나무를 수거하여 실험실에서 우화시켜 성충을 확보하였다. 확보된 성충은 사육용기에서 잣나무수피와 소나무수피를 먹이로 하여 상온에서 사육하여 7개체씩 선발하였고, 이들로부터 중장과 소화액을 추출 하였다.

수거한 중장과 소화액은 pH 6.8 Tris-HCl buffer가 들어있는 1.5 ml microtube에 넣어 마쇄한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 30분 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 -20°C에 보관하여 시료로 사용하였다.

전기영동

12% Native-PAGE(80V, 2h)를 Madley와 Hames(1981) 방법에 의해 실시하였다. 각 기질에 대한 염색은 pH 7.0 200 mM phosphate buffer(200 mM sodium phosphate monobasic, 200 mM sodium phosphate dibasic)와 20 mg fast blue RR salt를 사용하였다. 기질로는 1% α -naphthyl acetate, β -naphthyl acetate, α -naphthyl butyrate를 각각 사용하였다(Cho 등, 2007).

저해제에 의한 에스테라제의 활성 저해효과

북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충의 중장과 소화액에 존재하는 에스테라제의 활성과 저해제 처리에 따른 활성도 변화를 알아보기 위하여 카바메이트계통의 약제인 methomyl과 carbofuran, 유기인계통의 약제인 chlorpyrifos, methidation과 phenthoate, terpene계 약제인 bornyl acetate, α -pinene, camphor를 pH 7.0 200 mM phosphate buffer를 이용하여 최종농도를 0.1 mM로 희석하였다. Eserine은 7.5 mM로 농도로 사용하였다. 모든 저해제들과 수거된 소화액은 상온에서 30분간 반응 시킨 후 사용하였다(Cho 등, 2007).

결과 및 고찰

북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충 장내에 존재하는 에스테라제

북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충 장(gut)내 소화액에 존재하는 에스테라제의 종류와 기질에 따른 활성도 변화를 조사하였다. α -naphthyl acetate나 α -naphthyl butyrate를 이용하여 염색한 결과, 각각 4개의 밴드가 관찰되었고, 전기영동 이동순서에 따라 Est1, Est2, Est3, Est4로 명명 하였다(Fig. 1). β -naphthyl

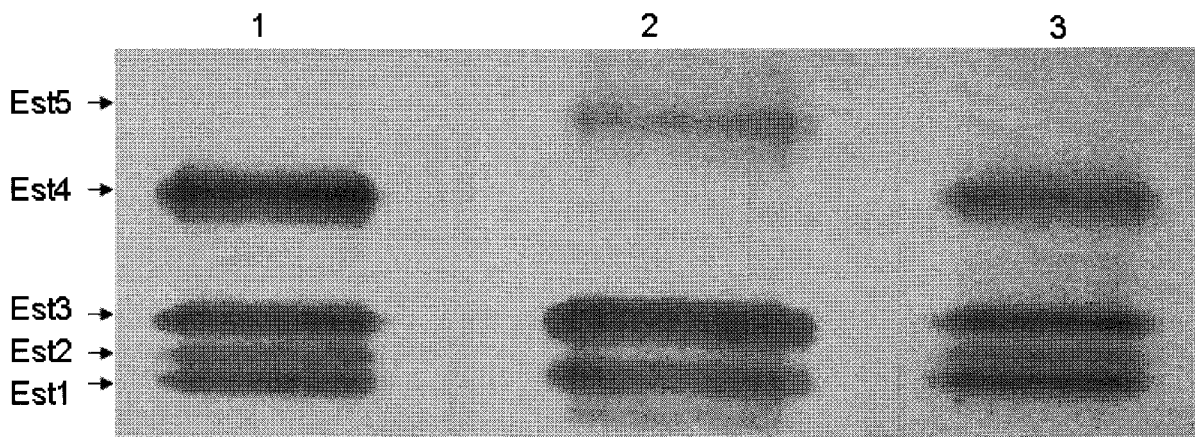


Fig. 1. Esterase activities from digestive juice of *M. saltuarius* adults on three substrates *in vitro*. Samples were separated on 12% Native-PAGE. 1; α -naphthyl acetate, 2; β -naphthyl acetate, 3; α -naphthyl butyrate.

acetate의 경우 4개의 밴드 외에 한 개의 밴드가 더 관찰 되었는데, 이를 Est5라 명명 하였다(Fig. 1). 이와 유사한 방법으로 파밤나방(*Spodoptera exigua* (Hübner))의 소화관내에서 20개의 에스테라제가 존재하는 것이 보고된바 있다(Kang과 Kim, 1998).

Fig. 1에서와 같이 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충 소화액내에는 적어도 4가지 이상의 에스테라제들이 존재하며, 이들 효소들은 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충의 주 먹이원인 잣나무나 소나무에서 방출되는 오일과 terpene의 소화 대사와 농약등 생체 이물질(xenobiotics)의 무독화 기능을 담당 할 것으로 생각된다. *Anthonomus grandis*는 먹이와 함께 지질과 오일을 섭식한 후 소화관과 소화액에 존재하는 에스테라제들로 가수분해 시켜 흡수하여 그들의 주요 에너지원으로 사용하고 있는 것으로 보고되었다(Jones과 Bancroft, 1986). 또한 Sun등(2006)은 *Aphis gossypii*에서 유기인계 농약에 대해 저항성을 가진 그룹과 감수성을 가진 두 그룹에 대하여 4가지 기질(α -naphthyl acetate(α -NA), α -naphthyl butyrate(α -NB), α -naphthyl phosphate(α -NP) β -naphthyl phosphate(β -NP))을 이용하여 에스테라제들을 조사하였고, 농약저항성을 가진 그룹은 어떤 특별한 에스테라제가 활성화 되고 있음을 보고하였다. 특히 관찰된 에스테라제들 중 소화관내에 존재하는 carboxylesterase계통의 효소들이 약제 무독화 기작과 관련이 있음을 보고하였다. 따라서 북방수염하늘소 성충의 소화액에 존재하는 4개의 에스테라제들의 특성과 종류를 파악하기 위하여 살충제들을 이용하여 이들 효소들의 활성도 변화를 관찰하였다.

살충제 처리와 소화액에 존재하는 에스테라제의

활성저해

주로 곤충의 표피를 통해 흡수되어 신경조직에 독성을 나타내는 카바메이트계(methomyl과 carbofuran), 유기인계(chlorpyrifos, methidation, phenthoate), 주로 소나무류에서 방출되는 식물의 방어물질인 terpene계(bornyl acetate, α -pinene, camphor)와 비특이적 콜린에스테라제에 저해작용을 나타내는 eserine를 처리하여 성충의 소화액내 에스테라제 활성도 변화와 특성을 조사하였다. 카바메이트계 약제인 methomyl에서 전반적으로 모든 에스테라제 밴드가 저해되는 현상이 관찰 되었으며, carbofuran에서는 미미한 효소활성 저해가 나타났다(Fig. 2). 그러나 Est1은 두 약제(methomyl과 carbofuran) 처리구에서 모두 강하게 저해가 나타나는 것으로 조사되었다.

유기인계 농약인 chlorpyrifos, methidation, phenthoate를 처리하여 비교한 결과 chlorpyrifos에서 모든 밴드들의 활성이 저해 되었다(Fig. 3). 특히 Est1은 카바메이트계 약제를 처리한 경우와 같이 chlorpyrifos에서도 효소활성이 완전히 저해되었으며, methidation에서 약 70%정도의 효소활성 저해가 관찰되었다. 하지만, phenthoate의 경우 Est1의 활성 저해는 관찰 할 수 없었다(Fig 3). 따라서 살충제들의 특성에 따라 에스테라제 활성 저해도 차이가 나타나는 것으로 조사 되었다(Cho 등, 2007). 일반적으로 카바메이트계와 유기인계 약제에 강하게 저해되는 것으로 관찰된 Est1은 오일의 소화대사와 함께 아세틸콜린에스테라제 계통의 밴드일 것으로 사료된다. 하지만 Est2, Est3, Est4는 카바메이트와 유기인계 약제 처리시 약한 효소활성 저해가 관찰 되었으나 지속적인 효소활성을 나타내는 것으로 보아 주로 소화계내에 존재하며 농약등 생체

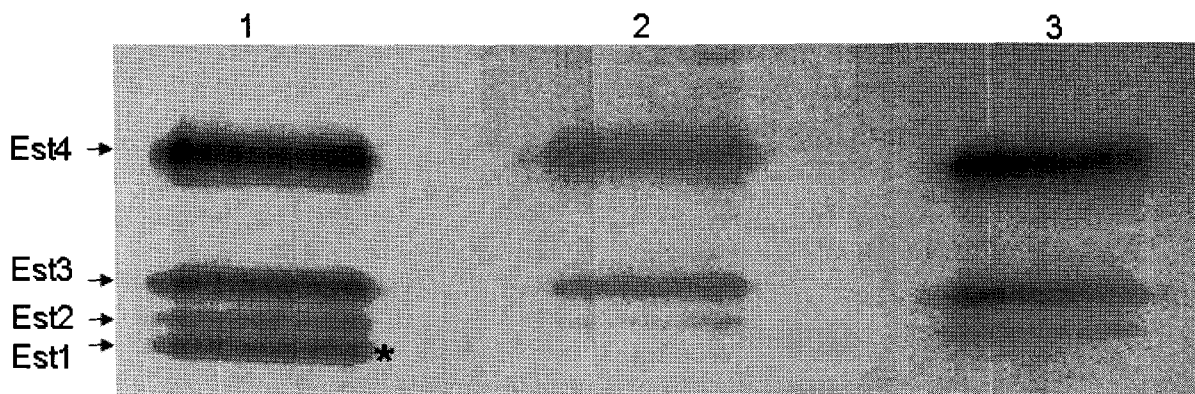


Fig. 2. Effects of carbamate insecticide on esterase activities in digestive juice of *M. saltuarius* adults *in vitro*. General esterase activity was assessed using the substrate α -naphthyl acetate and stained with Fast blue RR salt for 30 min. 1; control, 2; methomyl(0.1 mM), 3; carbofuran(0.1 mM), *; indicates specific band of the strongest esterase inhibition by methomyl and carbofuran.

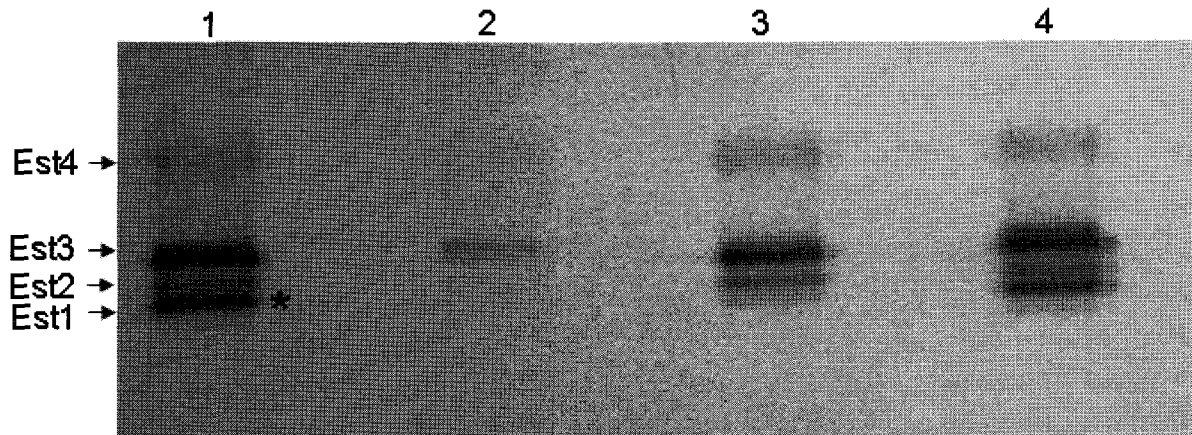


Fig. 3. Effects of organophosphate insecticide on esterase activities in digestive juice of *M. saltuarius* adults *in vitro*. General esterase activity was assessed using the substrate α -naphthyl acetate and stained with Fast blue RR salt for 30 min. 1; control, 2; chlorpyrifos(0.1 mM), 3; methidation (0.1 mM), 4; phenthoate, *; indicates specific band of the strongest esterase inhibition by chlorpyrifos.

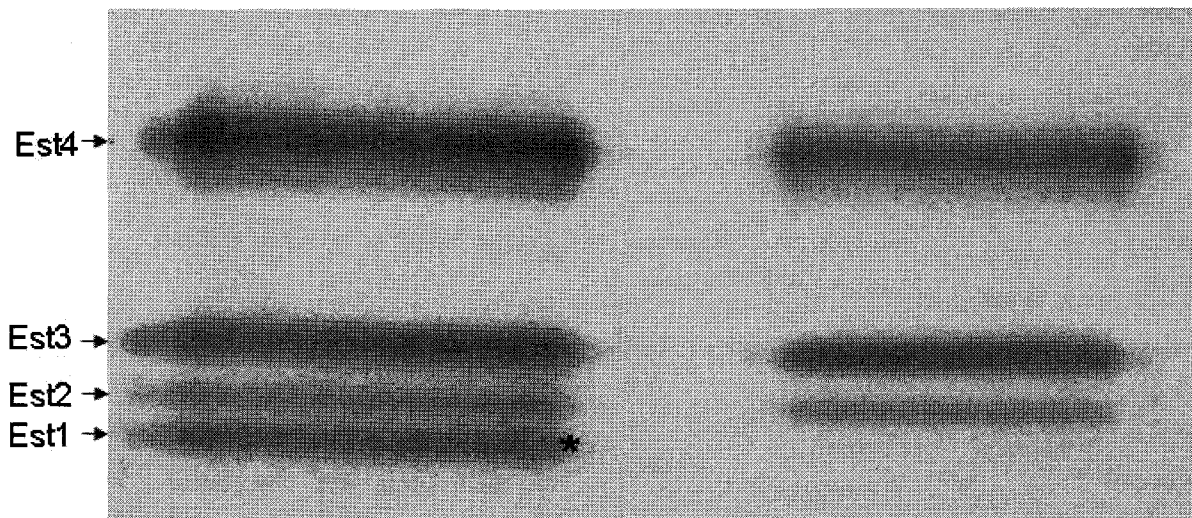


Fig. 4. Effects of eserine on esterase activities in digestive juice of *M. saltuarius* adults *in vitro*. General esterase activity was assessed using the substrate α -naphthyl acetate and stained with Fast blue RR salt for 30 min. 1; control, 2; eserine (7.5 mM), *; indicates specific bands of the strongest esterase inhibition by eserine.

이물질에 대한 무독화 기능을 담당하는 카르복실에스테라제(carboxylesterase)이거나 포스포트리에스테라제(phosphotriesterase)로 추측할 수 있다.

이들 효소들에 대한 특성을 정확히 규명하기 위해서는 여러 다른 보충 실험이 필요하고, 특히 효소들의 특성과 분류에 많이 이용되는 효소저해제들에 의한 활성도 변화 관찰이 필요할 것이다. 주로 신경조직에 분포하여 신경전달에 중요한 역할을 하는 아세틸콜린에스테라제는 곤충 종에 따라 차이를 보이지만 일반적으로 2개의 아세틸콜린에스테라제 유전자가 곤충 내에 존재한다고 밝혀져 있다. 최근 *Helicoverpa assulta*에서도 2개의 유전자가 보고되었다(Lee 등,

2006). 북방수염하늘소(*M. saltuarius*)에 대한 아세틸콜린에스테라제 유전자(들)의 정보와 특성은 현재까지 알려진 바 없다. 신경조직뿐 아니라 소화관내에 존재할 수 있는 이들 유전자들의 클로닝이 이루어지고 정확한 특성이 파악 된다면 향후 약제 저항성측면에서도 중요한 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Eserine을 처리한 효소 활성도 저해 실험을 통해 Est1이 아세틸콜린에스테라제 계통의 효소인 것을 재 확인하였다(Fig 4). Est1에서는 강한 활성도 저해가 나타났으나 Est2, Est3, Est4는 아주 미미한 효소활성 저해가 관찰 되었다(Fig 4). Eserine은 콜린에스테라제를 비특이적으로 저해한다(Calaf 등, 2007). 따라서 Est1이

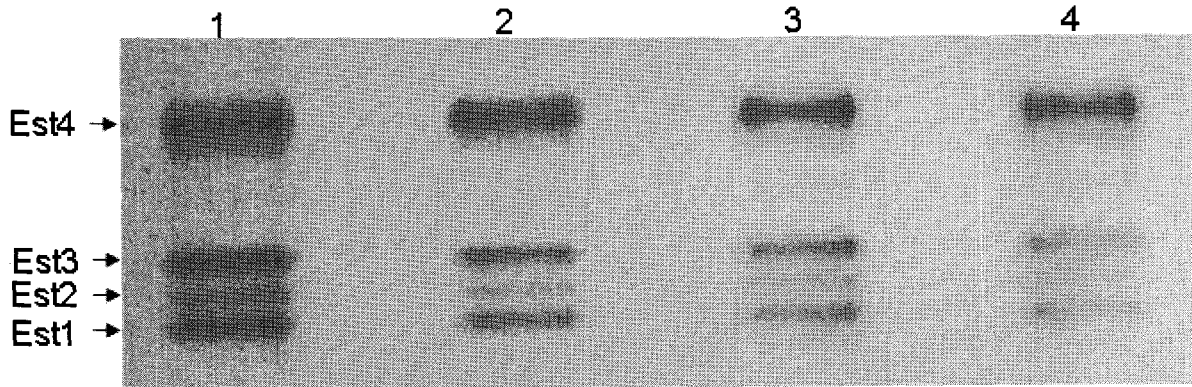


Fig. 5. Effects of terpene on esterase activities digestive juice of *M. saltuarius* adults *in vitro*. General esterase activity was assessed using the substrate α -naphthyl acetate and stained with Fast blue RR salt for 30 min. 1; control, 2; Borneyl acetate (0.1 mM), 3; α -pinene (0.1 mM), 4; camphor (0.1 mM).

Table 1. Esterase variation treated with various inhibitors. α -naphthyl acetate was used as substrate for staining esterase isozymes.

Est	Carbamate		Organophosphorus			Eserine	Terpene			Enzyme type	
	Methomyl	Carbo-furan	Chlor-pyrifos	Methi-dation	Pen-thoate		Borneylacetate	α -pinene	Camphor		
1	+++	+++	++ +	+++	++	-	++	+	-	+	Cholin-esterase
2	++	+	+++	-	-	-	+	+	-	+	Cholin-esterase
3	++	+	+	-	-	-	+	+	-	-	N.D
4	++	-	+	-	-	-	+	-	-	-	N.D

+++; over 90% inhibition, ++; ~70% inhibition, +; ~50% inhibition, -; non-inhibition, N.D.; In progress.

eserine, 카바메이트계, 유기인계 약제 의해 효소 활성이 강하게 저해되는 것으로 보아 Est1은 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충 장(gut)내 소화액에 존재하는 콜린에스테라제계통의 효소로 생각된다.

Terpene계 약제인 borneyl acetate, α -pinene, camphor를 비교 처리한 결과 borneyl acetate와 camphor에서 아주 미미한 효소 활성 저해가 나타났으며 α -pinene를 처리한 경우 에스테라제의 효소활성 저해는 전혀 관찰되지 않았다(Fig 5). Terpene은 침엽수를 포함한 거의 모든 식물에서 생성되는 것으로 여러 개의 이소프렌(isoprene, C_5H_8)이 모여서 된 탄화수소의 일종으로 지금까지 알려진 종류로는 약 20,000여 가지가 알려져 있다(Tholl, 2006). Terpene류는 크게 4가지(hemiterpenes(C_5), monoterpenes(C_{10}), sesquiterpenes(C_{15}), diterpenes)로 분류되는데 이중 monoterpene류가 곤충의 생리, 생화학적 대사의 저해와 곤충의 기피현상의 원인이 되는 것으로 알려져 있어 해충방제에 많

이 이용되고 있다(Lee 등, 2003). 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충은 소나무류에 다량으로 존재하는 terpene을 주로 섭식하기 때문에 *in vitro*상에서 terpene류 처리시 소화효소들의 활성변화가 아주 미미하게 관찰된 것으로 생각되나 terpene이 효소생리에 영향을 주는지의 여부를 정확히 파악하기 위해서는 섭식 또는 도말 등과 같은 *in vivo*실험이 요구된다. 살충제 처리에 따른 각 에스테라제들의 활성도 변화를 Table 1에 요약하였다.

이상의 결과에서 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충의 장 내 소화액에는 적어도 4개의 에스테라제가 존재하며 소화효소로서의 기능뿐 아니라 살충제의 무독화 기능을 담당하는 에스테라제들도 존재하는 것으로 조사 되었다. 위 결과를 바탕으로 이들 에스테라제들의 보다 정확한 특성이 밝혀진다면 앞으로 산림, 농업, 농약과학의 기초 자료로 이용 될 수 있을 것이다.

인용문헌

- Calaf, G. M., E. Parra and F. Garrido (2007) Cell proliferation and tumor formation induced by eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, in rat mammary gland. *Oncol. Rep.* 17(1):25~33.
- Cho S. Y., Y. M. Park and Y. C. Park (2007) Evaluation of toxicity of 23 pesticides against *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) eggs and adults: Effect on esterase activity, hatchability, and fecundity. *The Korean Journal of Pesticide Science.* 11(1):1~7.
- Costa, L. G. (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta.* 366:1~13.
- Field, L. M., A. L. Devonshire and B. G. Forde (1988) Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.* 251:309~312.
- Kang, S. Y. and Y. G. Kim (1998) Esterase isozymes of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner), with development and tissue. *Korean J. Appl. Entomol.* 37(2):179~185.
- Jones, B. R. and H. R. Bancroft (1986) Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive, and fat-body tissues of the adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. *Biochem. Genet.* 24:499~508.
- Lee, D. W., S. S. Kim, S. W. Shina, W. T. Kim and K. S. Boo (2006) Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenée). *Biochimica et Biophysica Acta.* 1760(2):125~133.
- Lee, S. Y., Yoo J. S., Moon S. J., Lee S. G., Kim C. S., Shin S. C. and G. H. Kim (2003) Fumigant and repellency effects terpene against the two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 42(3):249~255.
- Madley, I. C. and B. D. Hames (1981) An analysis of discoidin I binding sites in *Dictyostelium discoideum* (NC4). *Biochem. J.* 200:83-91.
- Raftos, D. A. (1989) The biochemical basis of malathion resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 26:302~309.
- Raymond, M., V. Beyssat-Arnaouty, N. Sivasubramanian, C. Mouches, G.P. Georghiou and N. Pasteur (1989) Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex mosquitoes*. *Biochem. Genet.* 27:417~423.
- Srinivas, R., S. K. Jayalaksmi and K. Sreeramulu (2004) Hydrolysis of organophosphorus compounds by an esterase isozyme from insecticide resistant pest *Helicoverpa armigera*, *Ind. J. Exp. Biol.* 42:214~216.
- Srinivas, R., S. K. Jayalakshmi, K. Sreeramulu, N. E. Sherman and J. Rao (2006) Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochim. Biophys. Acta.* 1760(3):310~317.
- Sun, L., X. Zhou, J. Zhang and X. Gao (2006) Polymorphisms in a carboxylesterase gene between organophosphate-resistant and -susceptible *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 98(4):1325~1332.
- Tholl, D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology.* 9(3):297~304.
- Zhou, X., M. E. Scharf, G. Sarath, L. J. Meinke, L. D. Chandler and B. D. Siegfried (2004) Partial purification and characterization of a methyl-parathion resistance-associated general esterase in *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 78:114~125.
- Ziegler, R., S. Whyard, A. E. R. Downe, G. R. Wyatt and V.K. Walker (1987) General esterase, malathion carboxylesterase and malathion resistance in *Culex tarsalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28:279~285.

북방수염하늘소(*Monochamus saltuarius*) 성충의 살충제 처리에 따른 소화 효소의 활성 변화**박용철 · 조세열^{1*}**

강원대학교 BT 특성화 학부 식물생명공학

¹*Division of Metabolism, Endocrinology, and Diabetes, University of Michigan*

요약 : 북방수염하늘소(*M. saltuarius*) 성충 장(gut)내에 존재하는 소화액에 대한 에스테라제(esterase)의 활성 변화를 *in vitro*에서 조사하였다. α -naphthyl acetate와 α -naphthyl butyrate 기질을 이용한 실험에서는 4개의 밴드가 관찰되었다. Carbofuran과 methomyl을 비교 처리한 결과 methomyl에서 강한 효소활성 저해가 관찰되었다. 특히 Est1은 carbofuran과 methomyl에 의해 모두 저해되는 것으로 나타났다. Chlorpyrifos, methidation, phenthoate를 비교 처리한 결과 chlorpyrifos에 의해 모든 밴드들이 저해되는 것을 볼 수 있었다. 특히 Est1은 chlorpyrifos에 의해 효소활성이 완전히 저해되었고, methidation 처리시 약 70% 정도의 효소활성이 저해되었다. Eserine을 처리한 결과 Est1은 약 70% 정도의 활성 저해를, Est2, Est3, Est4에서는 미미한 효소활성 저해가 나타났다. α -pinene에서는 뚜렷한 효소활성 저해는 관찰할 수 없었으나 bornyl acetate와 camphor에서는 미미한 효소활성 저해가 관찰 되었다.

색인어 : 북방수염하늘소 성충, 에스테라제, 카바메이트계, 유기인계