

파밤나방 유충의 조직별 지방산 구성과 세포성 인지질분해효소의 역할

김용균* · 이승희 · 서승환 · 김건우

안동대학교 생명자원과학과

Fatty Acid Composition of Different tissues of *Spodoptera exigua* Larvae and a Role of Cellular Phospholipase A₂

Yonggyun Kim*, Seunghee Lee, Seunghwan Seo and Kunwoo Kim

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

ABSTRACT: Eicosanoids are a group of C20 oxygenated polyunsaturated fatty acids (PUFAs). To monitor biosynthetic precursors of these PUFAs, this study extracted fatty acids from different tissues of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and assessed their compositions using GC/MS. Fifth instar larvae were dissected to isolate different tissues of gut, fat body, hemocytes, and integument. From each tissue, total lipids were extracted and fractionated into neutral lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL). Most tissues contained palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2), and linolenic acid (18:3). However, their compositions were different among tissues and lipid types. Fat body and hemocytes possessed other type of fatty acids such as myristic acid (14:0) and three unknown fatty acids. Among lipid types, PL contained relatively high levels of linolenic acid than NL and GL, while it had lower saturated fatty acids. Total unsaturated fatty acid composition was varied among tissues and lipid types. PL was rich in unsaturated fatty acids in fat body, gut, and hemocytes. There was a significant influence of calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) on maintaining fatty acid composition because RNA interference of iPLA₂ expression significantly modified fatty acid compositions in NL and PL. However, this study did not detect arachidonic acid, a main eicosanoid biosynthesis precursor, in all tissues. This suggests an alternative biosynthesis of eicosanoids in insects, which is distinct from the biosynthetic pathway of mammals.

Key words: Eicosanoid, Fatty acid, Phospholipase, *Spodoptera exigua*

조 록: 아이코사노이드는 탄소수 20 개의 다가불포화지방산 산화물로 구성된다. 이들 다가불포화지방산의 생합성 전구물질을 탐지하기 위해 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 서로 다른 조직으로부터 지방산을 분리하여 GC/MS로 조성을 분석하였다. 파밤나방 5령 유충에서 소화관, 지방체, 혈구 및 체벽을 분리하고, 각 조직에서 지질을 추출하여 각각 중성지질, 당지질 및 인지질로 분리하였다. 대부분의 조직은 palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) 그리고 linolenic acid (18:3)를 주요 지방산으로 함유하였다. 그러나 이들 지방산의 조성은 조직과 지질 종류에 따라 상이하였다. 지방체와 혈구세포는 이들 주요 지방산 이외에 myristic acid (14:0)와 3 종류의 미동정 지방산들이 추가로 검출되었다. 서로 다른 지질 종류 가운데 인지질은 중성지질이나 당지질에 비해 상대적으로 높은 linolenic acid를 지닌 반면 포화지방산의 함유량은 낮았다. 전체 불포화지방산의 조성도 조직과 지질 종류에 따라 상이하였다. 인지질은 지방체, 혈구 및 소화관에서 높은 불포화지방산 함유량을 나타냈다. 세포성 인지질분해효소인 calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂)는 지방산 조성을 조절하는 데 역할을 담당하였다. 이 유전자의 RNA 간섭은 중성지질과 인지질에서 지방산 조성의 변화를 유발하였다. 본 연구는 아이코사노이드 생합성의 전구물질로 여겨지는 아라키도닉산을 검출하지 못했다. 이는 곤충에 있어서 아이코사노이드는 포유동물과는 다른 새로운 생합성 과정을 통해 형성되는 것으로 추정된다.

검색어: 아이코사노이드, 지방산, 인지질분해효소, 파밤나방

아이코사노이드(eicosanoid)는 다가불포화지방산의 산화물

이다. 특별히 탄소수 20 개의 아라키도닉산(arachidonic acid)을 전구물질로 cyclooxygenase (COX) 또는 lipoxygenase (LOX)의 산화작용에 의해 prostaglandin (PG)과 leukotrien (LT)의 아이코사노이드류를 생합성하게 된다. 척추동물은 물론이고 곤

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received March 3 2016; Revised April 1 2016

Accepted May 12 2016

층에 있어서 이들 아이코사노이드류는 곤충의 면역, 배설 및 생식 생리 작용을 증대한다(Stanley and Kim, 2014). 박각시나방류인 *Manduca sexta*의 경우 아이코사노이드 생합성 억제제는 세포성 면역을 억제시켰다(Stanley-Samuelson et al., 1991). 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 아이코사노이드 생합성 과정을 억제하면 그람 음성균에 대해서 반응하는 IMD 체액성 면역 신호전달과정을 교란했다(Yajima et al., 2003). 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 경우 아이코사노이드 생합성 반응을 억제시킨 상태에서 다양한 PG와 LT를 투여한 결과 세포성 및 체액성 면역반응이 야기되었다(Shrestha and Kim, 2009). 이러한 면역 반응 이외에 아이코사노이드류는 말피기관의 물질분비 과정을 증대하여 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)와 볼개미류(*Formica polyctena*)에서 배설을 촉진시켰다(Petzel and Stanley-Samuelson, 1992; Van Kerkhove et al., 1995). 또한 아이코사노이드류는 곤충의 체온 조절에도 관여하여 사막 매미류(*Tibicen dealbatus*)의 기화열 발생을 증대하였다(Toolson et al., 1994). 아울러 아이코사노이드는 생식과정을 증대하여 귀뚜라미류의 산란행동을 촉진시켰다(Stanley-Samuelson and Loher, 1983; Stanley-Samuelson et al., 1986). 따라서 다양한 곤충 생리반응을 증대하는 아이코사노이드에 대한 교란은 새로운 해충방제제 개발의 방향을 제공할 수 있다(Kim, 2014).

곤충에서 아이코사노이드 생합성 과정을 밝히는 데 다양한 연구가 진행되어 왔다. 이러한 연구는 크게 두 가지 방향으로 주력되었다. 하나는 곤충 체내에 존재하는 아이코사노이드류의 화학구조를 밝히려는 연구 방향이고, 다른 하나는 이들 물질의 생합성 과정에 관여하는 효소들과 이들 유전자 구조를 밝히는 것이다. 멸강나방류(*Pseudaletia unipuncta*)를 대상으로 혈림프 시료에서 PGF_{2α}가 검출되었다(Jurenka et al., 1999). 비감염 유충의 경우 0.9 ± 0.3 pg/mL의 수준에서 세균에 감염되면 4.0 ± 0.9 pg/mL으로 혈림프 내에 PGF_{2α} 농도가 증가하였다. 또 다른 PG류로서 귀뚜라미류(*Acheta domesticus*) 체내에서 PGE₂가 동정되었다(Destephano et al., 1974). 이들 아이코사노이드를 생합성하는 체내 기구로서 분비성 phospholipase A₂ (PLA₂)가 거릿쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)에서 최초로 동정되었다(Shrestha et al., 2010). 더불어 최근 파밤나방의 혈구세포에서 특이적으로 발견되는 세포성 PLA₂가 동정되었다. 이후 유리된 아라키도닉산을 산화시키기 위해 COX 유전자가 파밤나방에서 동정되었다(Park et al., 2014). 이러한 일련의 연구 과정 속에 아직도 풀리지 않은 의문점은 아이코사노이드 생합성 전구 물질이다. 이러한 이유는 아이코사노이드 생합성에 가장 잘 알려진 전구물질인 아라키도닉산이 곤충에서는 부재하거나 매우 낮은 농도로 존재하기 때문이다(Howard and Stanley-Samuelson, 1996).

본 연구는 아이코사노이드 기능과 생합성 과정 모두에서 생리적 기능이 밝혀진 파밤나방을 모델로 다양한 조직에 존재하는 지질류에서 지방산을 분석하여 아이코사노이드 생합성 전구물질을 추적하였다. 또한 기존에 파밤나방에서 동정된 세포성 PLA₂가 조직의 지방산 조성 변화에 영향을 줄 수 있는 지도 함께 분석되었다.

재료 및 방법

파밤나방 사육 및 조직 분리

파밤나방은 Shrestha et al. (2010)의 방법으로 사육하였다. 본 연구에 사용한 공시충은 몸의 크기가 비교적 가장 큰 5령 2-3일(25℃) 경과 유충을 이용하였다. 혈구세포는 혈림프 시료에서 얻었다. 유충의 복부 다리를 자른 후 흘러나오는 혈림프를 phenylthiourea가 소량 들어있는 튜브에 받았다. 이를 5,000 rpm에서 5 분간 원심분리 후 침전된 혈구세포를 수거하였다. 동일한 유충에서 소화관, 지방체 및 체벽 조직을 인산완충용액(PBS: 100 mM phosphate buffered saline, pH 7.4)에서 해부하여 각각 수거하였다. 지방산 분석을 위해 각 반복 당 약 150 마리의 유충이 조직 추출에 이용되었다.

조직 유래 지질 분리

파밤나방 5령 유충의 조직 시료량 대비 20 배의 *n*-hexane과 tert-butyl methyl ether (MTBE) 혼합액(1:1, v/v)을 가하여 20 분간 초음파 처리(Branson, USA)하면서 2 회 추출하였다. Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 잔사에 대해 Folch et al. (1957)의 방법에 준하여 동량의 클로로포름: 메탄올(2:1, v/v)로 2 회 추출하였다. 중성지질, 당지질 및 인지질의 분리를 위해 클로로포름: 메탄올 추출물에 대한 실리카겔 컬럼(5.5 × 40 mm) 크로마토그래피를 실시하였으며, 활성화시킨 실리카겔(70~230 mesh, Merck)을 충전한 후 용매 극성에 따라 클로로포름, 아세톤, 메탄올을 순차적으로 용출하여 각각 중성지질, 당지질 및 인지질을 차례로 분획하였다. 추출 여액 및 각각의 분획물은 40℃ 이하에서 감압농축하였고 질소로 건조시킨 후 지방산 분석까지 -20℃에 보관하였다.

유리 지방산 분석

핵산 추출 및 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 획득된 지질을 MIDI 방법(<http://www.youngin.com/application/MIDI-2.pdf>)

을 통해 유리지방산을 추출 및 메틸화를 실시하였다. 간략하게, 지질 가수분해 반응용액(45 g sodium hydroxide, 150 mL methanol, 150 mL H₂O)을 각 지질 시료에 1 mL 첨가하고 100°C에서 30 분간 알칼리분해가 이뤄졌다. 이후 유리된 지방산을 메틸화하기 위해 메틸화용액(325 mL 6 N HCl, 275 mL methanol)을 각 시료에 2 mL 첨가하였다. 이후 80°C에서 10 분간 반응시켰다. 메틸화된 지방산을 분리하기 위해 비극성용매(50 mL 헥산, 50 mL MTBE)를 각 시료에 1.25 mL 첨가했다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 상층액을 얻었다. 이 상층액을 중화시킨 후 GC/MS 분석에 이용하였다. GC/MS 분석을 위한 컬럼은 SP-2560 (100 m × 0.25 mm i.d., 0.2 μm film thickness, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA)을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 100°C에서 4 분 동안 유지한 후 240°C까지 분당 3°C씩 증가하여 15 분 동안 유지하였다. 이동상 가스는 헬륨으로 0.8 mL/min, injector 225°C, ion source 200°C, separator 240°C로 설정하였다. 각각의 시료는 1 μL를 주입하여 분석하였고, split ratio는 20:1의 비율이었다. 분리된 피크는 Supelco사 표준지방산 methyl ester의 머무름 시간과 비교하여 확인하였으며, 피크 면적비로서 지방산 조성 백분율을 구하였다. 또한 GC에 의해 분리된 피크의 mass spectrum을 GC/MS data system인 MS Chemstation (Hewlett Packard)에 설치된 NIST 및 Wiley library와의 검색·비교를 통해 지방산을 동정하였다. 지방산 분석은 독립적으로 3 회 이상 조직을 추출하여 분석하였다.

인지질분해효소의 RNA 간섭

파밤나방 유래 PLA₂ 유전자의 발현을 억제하는 RNA 간섭은 Park et al. (2015)의 방법을 따라 double stranded RNA (dsRNA)를 제조하였다. 대조구로서 폴리드나바이러스 유전

자 OF302 (Park and Kim, 2010)에 특이적 dsRNA를 dsCON으로 이용하였다. 이렇게 준비된 dsRNA를 세포내 전달 물질인 Metafectene PRO (Biont, Planegg, Germany)와 1:1 (v/v)으로 혼합하고 25°C에서 30 분간 반응시켜 dsRNA를 포함하는 리포솜을 형성시켰다. 이 리포솜을 5령 1일째되는 파밤나방 유충 혈강에 26 gauge needle이 부착된 미세주사위(Hamilton, Reno, Nevada, USA)로 마리 당 1 μg의 dsRNA를 주입시켰다. dsRNA 처리 후 48 시간이 경과한 후 조직을 추출하여 상기의 방법으로 지방산 조성을 분석하였다.

통계분석

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 얻어진 ANOVA를 기초로 평균간 비교는 DUNCAN의 다중검정 방법을 이용하였다. 유의성은 Type I error = 0.05의 기준에서 차이를 구분하였다.

결과

조직별 다양한 지방산 분포

파밤나방 5령 유충을 대상으로 네 가지 서로 다른 조직에서 지질을 추출하였다. 추출된 지질은 중성지질, 당지질 및 인지질로 분리하였다. 이 세 종류의 지질을 대상으로 포함된 지방산 조성을 분석하였다. 네 조직이 가지고 있는 지방산의 종류는 다양하였다. 표피조직의 지방산을 분석한 결과(Table 1) palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid가 검출되었다. 이 가운데 포화지방산은 palmitic acid, 불포화지방

Table 1. Fatty acid composition in the integument of the fifth instar larvae of *S. exigua* according to lipid types: neural lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL)

Fatty acid (# carbon: # double bond)	Relative ratios (%) in different lipids ¹					
	NL	GL	PL	F	df	P
Myristic acid (14:0)	0	0	0	-	-	-
Palmitic acid (16:0)	26.8 ± 2.2	23.6 ± 2.3	36.4 ± 21.7	1.66	2,15	0.2230
Stearic acid (18:0)	0	5.2 ± 2.6	11.5 ± 8.3	3.21	1,10	0.1035
Palmitoleic acid (16:1)	0	0	0	-	-	-
Oleic acid (18:1)	27.6 ± 1.1	14.6 ± 7.2	8.9 ± 4.5	22.79	2,15	<0.0001
Linoleic acid (18:2)	45.5 ± 2.5	41.6 ± 6.2	34.4 ± 20.2	1.27	2,15	0.3097
Linolenic acid (18:3)	0	15.0 ± 10.1	37.2 ± 20.7	4.15	1,10	0.0689

¹ '0' represents 'not detected in this assay condition'

Table 2. Fatty acid composition in the fat body of the fifth instar larvae of *S. exigua* according to lipid types: neural lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL)

Fatty acid (# carbon: # double bond)	Relative ratios (%) in different lipids ¹					
	NL	GL	PL	F	df	P
Myristic acid (14:0)	0.1 ± 0.2	0.8 ± 1.4	0	2.32	1,9	0.1620
Palmitic acid (16:0)	32.9 ± 1.2	24.6 ± 6.8	18.4 ± 2.1	26.82	2,20	<0.0001
Stearic acid (18:0)	2.2 ± 1.0	6.7 ± 2.8	6.4 ± 2.7	9.31	2,20	0.0014
Palmitoleic acid (16:1)	1.6 ± 1.1	0	0	-	-	-
Oleic acid (18:1)	29.9 ± 3.3	12.2 ± 1.8	13.8 ± 1.5	132.84	2,20	<0.0001
Linoleic acid (18:2)	27.5 ± 3.0	36.4 ± 7.3	32.6 ± 2.5	6.97	2,20	0.0050
Linolenic acid (18:3)	5.8 ± 0.8	15.7 ± 6.9	27.0 ± 3.6	47.23	2,20	<0.0001
Unknown 1	0	1.4 ± 2.4	0	-	-	-
Unknown 2	0	1.7 ± 3.0	0	-	-	-
Unknown 3	0	2.7 ± 4.7	1.9 ± 4.8	0.10	1,13	0.7565

¹ '0' represents 'not detected in this assay condition'

Table 3. Fatty acid composition in the gut of the fifth instar larvae of *S. exigua* according to lipid types: neural lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL)

Fatty acid (# carbon: # double bond)	Relative ratios (%) in different lipids ¹					
	NL	GL	PL	F	df	P
Myristic acid (14:0)	0	0	0	-	-	-
Palmitic acid (16:0)	15.4 ± 3.0	26.9 ± 4.0	8.5 ± 6.8	14.56	2,9	0.0015
Stearic acid (18:0)	4.1 ± 0.9	8.4 ± 3.3	10.9 ± 5.2	3.64	2,9	0.0694
Palmitoleic acid (16:1)	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	0	0.00	1,2	0.9544
Oleic acid (18:1)	17.4 ± 2.6	16.0 ± 1.4	12.1 ± 2.1	7.06	2,9	0.0143
Linoleic acid (18:2)	50.5 ± 4.0	41.6 ± 4.6	33.9 ± 14.5	3.36	2,9	0.0814
Linolenic acid (18:3)	12.4 ± 0.9	6.9 ± 1.6	19.5 ± 15.4	2.01	2,9	0.1894
Unknown 1	0	0	10.4 ± 15.1	-	-	-
Unknown 2	0	0	0.8 ± 1.1	-	-	-

¹ '0' represents 'not detected in this assay condition'

산은 linoleic acid가 가장 많이 포함되어 있었다. 지질별로 살펴보면, 중성지질은 비교적 단순한 지방산 조성을 가지고 있었다. 반면에 당지질과 인지질은 보다 다양한 지질을 포함하고 있었으며, 특별히 oleic acid와 linolenic acid에서 이들 지질별로 차이가 나는 조성을 나타냈다. 불포화지방산 조성 가운데 인지질의 경우 다른 지질에 비해 oleic acid를 적게 포함하고 있지만, linolenic acid는 가장 많이 포함하고 있는 지방산으로 나타났다.

지방체 조직의 지방산 조성을 살펴보면(Table 2), 표피조직과 유사한 조성을 나타내지만, 여기에 myristic acid와 palmitoleic acid가 추가로 검출되었다. 또한 미확인된 3 가지 지방산도 검출되었다. 세 지질 모두 포화지방산은 palmitic acid가 대표적이거나, 불포화지방산의 경우 중성지질은 oleic acid를 그리고 다른 지질은 linoleic acid를 우점 지방산으로 함유하고 있었다. 인

지질의 경우 포화지방산인 palmitic acid를 다른 지질에 비해 적게 갖는 반면, linolenic acid를 다른 지질에 비해 많게는 5 배 가량 많이 포함하고 있다. 더불어 당지질과 인지질은 미확인 지방산 3 종류를 포함했다.

소화관의 지질별 지방산 조성이 분석되었다(Table 3). 이 조직에서는 포화지방산으로 palmitic acid와 stearic acid가 검출되었고, 불포화지방산으로 palmitoleic acid, oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid가 검출되었다. 이 조직에서도 지방체에서 검출되었던 동일한 두 가지 미확인 지방산 종류가 검출되었다. 지질별로 살펴보면, 포화지방산의 경우 중성지질과 당지질은 palmitic acid가 우점하나, 인지질의 경우 stearic acid가 우점하였다. 불포화지방산의 경우는 모두 linoleic acid를 우점 지방산으로 함유하고 있었다. 인지질의 경우 포화지방산인 palmitic

Table 4. Fatty acid composition in the hemocytes of the fifth instar larvae of *S. exigua* according to lipid types: neural lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL)

Fatty acid (# carbon: # double bond)	Relative ratios (%) in different lipids ¹					
	NL	GL	PL	F	df	P
Myristic acid (14:0)	0	2.6 ± 0.1	0	-	-	-
Palmitic acid (16:0)	25.1 ± 0.9	34.6 ± 6.6	22.5 ± 7.2	2.51	2,3	0.2289
Stearic acid (18:0)	2.3 ± 0.7	9.1 ± 4.8	0	3.90	1,2	0.1870
Palmitoleic acid (16:1)	1.2 ± 0	0	0	-	-	-
Oleic acid (18:1)	22.4 ± 0.4	14.2 ± 7.3	10.0 ± 0.7	4.36	2,3	0.1296
Linoleic acid (18:2)	27.0 ± 19.5	27.8 ± 6.8	36.5 ± 13.9	0.27	2,3	0.7830
Linolenic acid (18:3)	4.9 ± 4.0	6.6 ± 1.1	32.8 ± 1.5	75.28	2,3	0.0027
Unknown 1	1.1 ± 0	0	0	-	-	-
Unknown 2	1.5 ± 0	5.2 ± 3.9	11.5 ± 3.1	3.09	2,2	0.2443
Unknown 3	32.9 ± 0	0	0	-	-	-

¹ '0' represents 'not detected in this assay condition'

Table 5. ANOVA on fatty acid (FA) compositions of four tissues (gut, fat body, hemocyte, and integument) and their three lipid types (neutral lipid, glycolipid, and phospholipid) of *S. exigua* larvae. 'df', 'SS' and 'MS' represent 'degree of freedom', 'sum of square', and 'mean square', respectively

(A) All tissues					
Source	df	SS	MS	F	P
Tissue	3	783.92	261.31	4.22	0.0061
LIPID	2	115.03	57.51	0.93	0.3959
FA	9	23625.68	2625.08	42.43	< 0.0001
Tissue*LIPID	6	693.13	115.52	1.87	0.0863
Tissue*FA	17	2438.39	143.43	2.32	0.0026
LIPID*FA	13	6322.93	486.38	7.86	< 0.0001
Error	287	17754.93	61.86		
Total	340	73913.85			
(B) Integument					
Source	df	SS	MS	F	P
LIPID	2	1033.39	516.70	3.73	0.0291
FA	4	8104.83	2026.21	14.65	<0.0001
LIPID*FA	6	2590.92	431.82	3.12	0.0095
Error	65	8992.05	138.34		
Total	77	21696.09			
(C) Fat body					
Source	df	SS	MS	F	P
LIPID	2	1.49	0.75	0.06	0.9428
FA	9	18375.48	2041.72	161.41	<0.0001
LIPID*FA	10	4541.63	454.16	35.91	<0.0001
Error	133	1682.32	12.65		
Total	154	25290.44			

Table 5. Continued

(D) Gut					
Source	df	SS	MS	F	P
LIPID	2	118.45	59.22	1.20	0.3100
FA	7	10454.49	1493.49	30.22	<0.0001
LIPID*FA	9	1606.16	178.46	3.61	0.0015
Error	51	2520.10	49.41		
Total	69	14777.16			
(E) Hemocyte					
Source	df	SS	MS	F	P
LIPID	2	236.30	118.15	2.39	0.1218
FA	9	3639.60	404.40	8.18	0.0001
LIPID*FA	9	1304.11	144.90	2.93	0.0269
Error	17	840.56	49.44		
Total	37	6317.47			

acid를 다른 지질에 비해 적게 갖는 반면, linolenic acid를 다른 지질에 비해 많이 포함하고 있다. 모든 미확인 지방산은 인지질에서만 검출되었다.

혈구세포 조직에서 지질이 추출되고 각 지질별 지방산 조성이 분석되었다(Table 4). 이 조직에서는 포화지방산으로 myristic acid, palmitic acid와 stearic acid가 검출되었고, 불포화지방산으로 palmitoleic acid, oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid가 검출되었다. 이 조직에서도 지방체에서 검출되었던 동일한 세 가지 미확인 지방산 종류가 검출되었다. 지질별로 살펴보면, 포화지방산의 경우 palmitic acid가 우점하고 불포화지방산의 경우는 모두 linoleic acid를 우점 지방산으로 함유하고 있었다. 인지질의 경우 포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid를 다른 지질에 비해 적게 갖는 반면, linolenic acid를 다른 지질에 비해 많이 포함하고 있다.

조직별 그리고 지질 종류별 지방산 조성 차이에 대해서 유의성을 검증하였다(Table 5). 모든 조직 및 지질 종류에서 지방산의 조성은 큰 차이를 나타냈다(변수 'FA'에 해당하는 변이원, Table 5A). 이들 지방산 조성의 차이는 조직별로 큰 차이를 나타냈다(변수 'Tissue'에 해당하는 변이원, Table 5A). 그러나 지질 종류에 따라서는 전체적으로 큰 차이를 보이지 않았다(변수 'LIPID'에 해당하는 변이원, Table 5A). 그러나 조직별로 분석하여 보면 지질별로 큰 차이를 보인 조직이 표피세포라는 것을 알 수 있다(Table 5B).

아이코사노이드 생합성에 중요한 불포화지방산의 조성을 조직별 및 지질별로 산출하였다(Fig. 1). 전체적으로 불포화지방산은 51-81%의 조성비를 나타냈다. 이러한 불포화지방산의

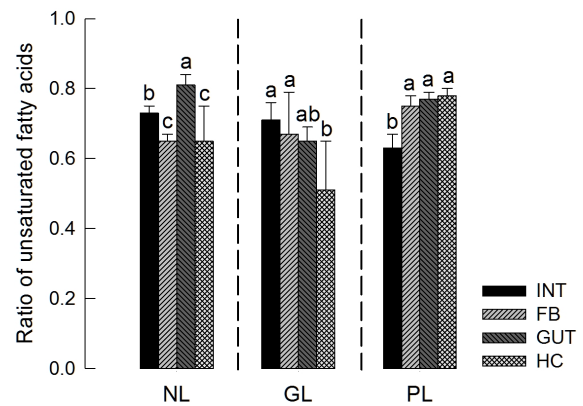


Fig. 1. Variation in unsaturated fatty acid compositions among different tissues and lipids of 5th instar larvae of *S. exigua*. Four tissues are integument (INT), fat body (FB), gut (GUT), and hemocyte (HC). Three different lipids are neural lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL). Each treatment was replicated more than three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference at Type I error = 0.05 (Duncan's multiple range test) among means in each lipid type.

조성은 조직별로 상이하였고($F = 3.89$; $df = 3, 47$; $P = 0.0146$), 또 지질별로도 상이하였다($F = 5.89$; $df = 2, 47$; $P = 0.0052$). 또한 지질별 불포화지방산의 조성 차이는 조직별로도 상이하였다($F = 8.07$; $df = 6, 47$; $P < 0.0001$). 따라서 지방체와 소화관에서는 불포화지방산이 인지질에서 높지만, 표피조직에서는 인지질에서 가장 낮은 불포화지방산 조성을 나타냈다.

지방산 조성에 미치는 iPLA₂의 역할

칼슘비의존형 iPLA₂가 조직별 지방산 조성에 미치는 영향

Table 6. Influence of RNA interference of iPLA₂ on fatty acid compositions in three lipid types of *S. exigua* larvae: neutral lipid (NL), glycolipid (GL), and phospholipid (PL)

(A) Fat body				
Lipid types	Fatty acids	Relative ratios (%) ¹		Statistics
		dsCON	dsiPLA ₂	
NL	Myristic acid (14:0)	0	0.50	X ² = 46.57, df = 6 P < 0.0001
	Palmitic acid (16:0)	24.97	35.27	
	Stearic acid (18:0)	0	3.73	
	Palmitoleic acid (16:1)	0	1.80	
	Oleic acid (18:1)	30.75	44.40	
	Linoleic acid (18:2)	36.03	0.67	
	Linolenic acid (18:3)	8.25	2.79	
GL	Myristic acid (14:0)	0	0	X ² = 5.20, df = 4 P = 0.2673
	Palmitic acid (16:0)	38.88	27.68	
	Stearic acid (18:0)	24.22	20.09	
	Palmitoleic acid (16:1)	0	0	
	Oleic acid (18:1)	11.54	13.75	
	Linoleic acid (18:2)	20.41	30.93	
	Linolenic acid (18:3)	4.94	7.55	
PL	Myristic acid (14:0)	0	0	X ² = 12.07, df = 4 P = 0.0168
	Palmitic acid (16:0)	17.22	24.26	
	Stearic acid (18:0)	1.08	11.34	
	Palmitoleic acid (16:1)	0	0	
	Oleic acid (18:1)	19.26	15.25	
	Linoleic acid (18:2)	43.41	36.69	
	Linolenic acid (18:3)	19.03	12.46	
(B) Gut				
Lipid types	Fatty acids	Relative ratios (%) ¹		Statistics
		dsCON	dsiPLA ₂	
NL	Myristic acid (14:0)	0.27	0	X ² = 17.80, df = 6 P = 0.0067
	Palmitic acid (16:0)	25.22	15.92	
	Stearic acid (18:0)	3.97	3.26	
	Palmitoleic acid (16:1)	1.67	0	
	Oleic acid (18:1)	35.38	18.88	
	Linoleic acid (18:2)	26.38	49.55	
	Linolenic acid (18:3)	6.29	11.656	
GL	Myristic acid (14:0)	0	0	X ² = 0.62, df = 4 P = 0.9606
	Palmitic acid (16:0)	22.61	26.58	
	Stearic acid (18:0)	15.06	16.36	
	Palmitoleic acid (16:1)	0	0	
	Oleic acid (18:1)	14.85	13.06	
	Linoleic acid (18:2)	40.79	37.88	
	Linolenic acid (18:3)	6.69	6.12	
PL	Myristic acid (14:0)	0	0	X ² = 4.09, df = 4 P = 0.3938
	Palmitic acid (16:0)	8.04	13.83	
	Stearic acid (18:0)	11.30	9.42	
	Palmitoleic acid (16:1)	0	0	
	Oleic acid (18:1)	14.78	15.25	
	Linoleic acid (18:2)	49.38	38.57	
	Linolenic acid (18:3)	16.50	22.94	

¹'dsCON' represents a control dsRNA specific to a viral gene. 'dsiPLA₂' represents a dsRNA specific to iPLA₂ of *S. exigua*.

을 분석하고자 이 유전자의 발현을 dsRNA로 억제시킨 후 지방체와 소화관 조직별 지방산 조성 변화를 추적하였다(Table 6). iPLA₂ 유전자 발현에 대한 RNA 간섭효과는 Park et al. (2015)에서 밝혀졌다. iPLA₂ 유전발현이 억제되는 조건에서 지방산 조성의 변화가 유발되었다. 지방체의 경우 이러한 변화는 중성지질과 인지질에서 탐지되었다(Table 6A). iPLA₂ 유전자의 발현 억제는 주요 포화지방산인 palmitic acid 조성 증가 및 주요 불포화지방산인 linoleic acid와 linolenic acid의 함량 감소를 일으켰다. 지방산 조성 변화가 소화관 중성지질에서 일어났지만, 변화의 양상은 달랐다(Table 6B). 지방체와 마찬가지로 포화지방산인 palmitic acid 조성 증가가 일어났지만, 불포화지방산의 감소는 oleic acid에서 나타났다. 오히려 linoleic acid와 linolenic acid의 함량은 다소 증가하였다.

고찰

파밤나방의 지방산 조성은 조직 및 지질 종류에 따라 상이하였다. 그러나 대부분은 주요 포화지방산으로 palmitic acid와 stearic acid를 함유하고 있으며, 주요 불포화지방산으로 oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid를 지니고 있었다. 이는 일반적인 동물류의 지방산 조성과 유사한 경향을 나타낸 것으로 판단된다(Fast, 1971). 특별히 본 연구와 유사한 방법으로 실시된 딱정벌레류(*Zophobas atratus*)의 경우도 이들 지방산이 여러 발육태 및 서로 다른 지질류에서도 이러한 종류들의 지방산이 주로 검출되었다(Howard and Stanley-Samuelson, 1996). 또한 인지질에서 불포화지방산이 높게 나타나는 것도 유사한 경향을 나타냈다. 그러나 특별히 차이가 나는 것은 α-linolenic acid (9,12,15-octadecatrienoic acid)의 함량이다. *Z. atratus*의 경우는 지방체에서 linoleic acid가 44.57%이고 linolenic acid가 0.35%인 반면에 파밤나방의 지방체 경우 linoleic acid가 32.6%이고 linolenic acid가 무려 27.0%를 차지하였다. 이렇게 높은 파밤나방의 linolenic acid의 함량은 체벽(37.2%), 소화관(19.5%) 그리고 혈구(32.8%)에서도 나타나고 있다. 그러나 본 연구에서 아이코사노이드의 생합성에 직접적 전구물질로 여겨진 아라키도닉산을 검출하지 못하였다. 이는 곤충이 지방산 조성에서 다른 동물과 차이점이 아라키도닉산 부재라는 특징(Bade, 1964)을 재확인시켜 주었다. 그럼에도 불구하고 여러 연구들에서 곤충 조직에서 직접적으로 아이코사노이드 생합성이 가능하다는 것을 시사하고 있다. 예를 들어, 박각시나방류인 *M. sexta* 혈구세포의 microsome 추출물은 아라키도닉산 기질을 변형하여 PGA₂, PGE₂, PGD₂와 PGF_{2α}를 생산할 수 있었다(Stanley-Samuelson and Ogg, 1994). 또한 진드기류(*Amblyomma*

americanum)에서는 프로스타글란딘 생합성 효소인 PGH synthase의 존재를 보여주었으며, 기내 합성 실험에 이용된 아라키도닉산 기질로부터 PGA₂/PGB₂, PGD₂, PGE₂ 및 PGF_{2α}를 생성하였다(Pedibhotla et al., 1995). 다시 *M. sexta*의 지방체는 위와 유사한 실험 진행에서 PG는 물론이고 5-hydroxyeicosatetraenoic acid의 LT류 아이코사노이드를 생합성하였다(Gadelhak et al., 1995). 이와 더불어 서론에서 언급하였듯이 파밤나방에서 동정된 다양한 PG 생합성 효소 유전자들(PLA₂, COX)의 존재는 곤충류가 아라키도닉산을 생합성하여 이를 PG 또는 LT로 생합성하고 이를 통해 다양한 생리작용을 증대할 것으로 보인다.

아라키도닉산이 없으면서 아이코사노이드를 생합성할 수 있는 곤충은 포유류에서 밝혀진 전형적 아이코사노이드 생합성과는 차이를 나타낼 수 있다. 첫째로 수서 곤충인 모기 유충은 아라키도닉산을 생합성하여 인지질에 축적하였다. Dadd and Kleijan (1979)은 집모기류(*Culex pipiens*)가 성충으로 발육하는 데 아라키도닉산을 요구하였다고 발표하였다. 모기의 먹이 가운데 아라키도닉산이 존재하기 어렵기 때문에 이는 자체에서 생합성이 이뤄져야한다는 것을 내포하였다. 또한 모기의 먹이에 아라키도닉산을 첨가하여 사육한 결과 주입된 아라키도닉산은 모기 조직의 인지질에 축적되었다(Stanley-Samuelson and Dadd, 1981). 이에 더불어 linoleic acid에서 아라키도닉산을 합성할 수 있는 간접적 증거가 나왔다. 우선은 동물체에서 합성하지 못하는 linoleic acid가 여러 곤충류에서 가능하였다(Blomquist et al., 1991). 이를 뒷받침하는 유전적 증거로서 Δ12 desaturase가 이들 곤충류에서 동정되었다(Cripps et al., 1990). 따라서 linoleic acid에서 사슬연장 및 불포화반응을 통해 C20의 다가불포화지방산의 생합성이 가능해질 수 있다. 예를 들어, 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 경우 α-linolenic acid를 유충 먹이 첨가할 경우 성충 조직에서 추출된 인지질 성분에 C20의 다가불포화지방산이 검출되었다(Stanley-Samuelson and Dadd, 1984). 이러한 아라키도닉산 생합성은 미국바퀴벌레(*Periplaneta americana*)와 귀뚜라미류(*Acheta domesticus*)에서도 밝혀졌다(Jurenka et al., 1987, 1988). 향후 곤충에서 리놀레익산에서 아라키도닉산을 합성하는 관련 효소 및 유전자의 동정이 기대된다.

조직별 및 지질 종류에 따라 상이한 지방산 조성은 이를 조절하는 인자의 존재를 제시하고 있다. 본 연구에서는 이러한 인자들 가운데 하나로서 칼슘에 비의존적 세포성 PLA₂를 주목하였다. 인지질 분해효소인 PLA₂는 척추동물의 경우 다양한 유전자군을 이루지만, 크게 세 종류로 나뉜다(Burke and Dennis, 2009). 우선 위치에 따라 세포성 PLA₂와 분비성 sPLA₂로 나뉘고, 세포성 PLA₂는 다시 칼슘의존도에 따라 칼슘의존형 cPLA₂

와 비의존형 iPLA₂로 구분된다. 특히 iPLA₂는 여러 기능에 관여하지만 척추동물의 경우 주로 생체막에 지방산 조성을 유지하는 데 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다(Balsinde et al., 1997; Barbour et al., 1999). 본 연구는 RNA 간섭으로 이 유전자의 발현을 억제한 경우 대조구에 비해 중성지질과 인지질에서 불포화지방산의 함량이 크게 낮아지고 포화지방산의 함량이 높아졌다. 이 iPLA₂가 파밤나방의 면역에 관여하는 것으로 판명되었기에(Park et al., 2015) 이러한 인지질 조성 변화와 더불어 iPLA₂는 여러 다른 생리적 반응에 관여할 것으로 여겨진다.

본 연구 궁극적 목표는 파밤나방 유충의 여러 조직에서 아이코사노이드의 전구체 다가불포화지방산을 찾는 데 주력하였다. 아라키도닉산을 검출하지는 못하였지만 다량의 다가불포화지방산들(linoleic acid와 linolenic acid)이 인지질에 보다 많이 분포하는 지방산 조성에 특징을 발견하였다. 따라서 외부 미생물의 침입에 대해서 면역신호는 이들 인지질에 연결된 불포화지방산을 아라키도닉산으로 전환하여 아이코사노이드 중개 물질을 생합성하는 데 이용될 수 있을 것으로 추정하며, 이에 대한 후속 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(313006-3).

Literature Cited

Bade, M.L., 1964. Biosynthesis of fatty acids in the roach, *Eurycotis floridana*. *J. Insect Physiol.* 10, 333-341.

Balsinde, J., Balboa, M.A., Dennis, E.A., 1997. Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ blocks phospholipid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 272, 29317-29321.

Barbour, S.E., Kapur, A., Deal, C.L., 1999. Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by calcium-independent phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 77-88.

Blomquist, G.J., Borgeson, C.E., Vundla, M., 1991. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. *Insect Biochem.* 21, 99-106.

Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, 5237-5242.

Cripps, C., Borgeson, C., Blomquist, G.J., de Renobales, M., 1990. The Δ^{12} desaturase from the house cricket *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae): Characterization and form of substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 46-51.

Dadd, R.H., Kleinjan, J.E., 1979. Essential fatty acid for the mosquito *Culex pipiens*: arachidonic acid. *J. Insect Physiol.* 25, 495-502.

Destephano, D.B., Brady, U.E., Lovins, R.E., 1974. Synthesis of prostaglandin by reproductive tissue of the male house cricket, *Acheta domesticus*. *Prostaglandins* 6, 71-79.

Fast, P., 1971. *Insect lipids*. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* 11, 181-242.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.

Gadelhak, G.G., Pedibhotla, V.K., Stanley-Samuelson, D.W., 1995. Eicosanoid biosynthesis by hemocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 743-749.

Howard, R.W., Stanley-Samuelson, D.W., 1996. Fatty acid composition of fat body and Malpighian tubules of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*: significance in eicosanoid-mediated physiology. *Comp. Biochem. Physiol. B* 115, 429-437.

Jurenka, R.A., de Renobales, M., Blomquist, G.J., 1987. *De novo* biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 255, 184-193.

Jurenka, R.A., Stanley-Samuelson, D.W., Loher, W., Blomquist, G.J., 1988. *De novo* biosynthesis of arachidonic acid and 5,11,14-eicosatrienoic acid in the cricket *Teleogryllus commodus*. *Biochim. Biophys. Acta* 963, 21-27.

Jurenka, R.A., Pedibhotla, V.K., Stanley, D.W., 1999. Prostaglandin production in response to bacterial infection in true armyworm larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41, 225-232.

Kim, Y., 2014. Development and application of novel biopesticides using insect immunosuppression, in: Park, Y., Chun, I., Kim Y., Lim, U.T., Lim, J. (Eds.), *Horticultural crops: development and application of novel technologies*. Institute of Andong National University Agricultural Science and Technology, Andong, Korea, pp. 38-112.

Park, B., Kim, Y., 2010. Transient transcription of a putative RNase containing BEN domain encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus induces an immunosuppression of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 156-163.

Park, J., Stanley, D., Kim, Y., 2014. Roles of peroxinectin in PGE₂-mediated cellular immunity in *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE* 9, e105717.

Park, Y., Kumar, S., Kanumuri, R., Stanley, D., Kim, Y., 2015. A novel calcium-independent cellular PLA₂ acts in insect immunity and larval growth. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 13-23.

Pedibhotla, V.K., Sarath, G., Sauer, J.R., Stanley-Samuelson, D.W., 1995. Prostaglandin biosynthesis and subcellular localization of prostaglandin H synthase activity in the lone star tick *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 1027-1039.

Petzelt, D.H. and Stanley-Samuelson, D.W. 1992. Inhibition of eicosanoid biosynthesis modulates basal fluid secretion in the Malpighian tubules of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J. Insect Physiol.* 38, 1-8.

- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Shrestha, S., Kim, Y., 2009. Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2077-2084.
- Shrestha, S., Park, Y., Stanley, D., Kim, Y., 2010. Genes encoding phospholipase A₂ mediate insect nodulation reactions to bacterial challenge. *J. Insect Physiol.* 56, 324-332.
- Stanley, D., Kim, Y., 2014. Eicosanoid signaling in insects; from discovery to plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33, 20-63.
- Stanley-Samuels, D.W., Dadd, R.H., 1981. Arachidonic acid and other tissue fatty acids of *Culex pipiens* reared with various concentrations of dietary arachidonic acid. *J. Insect Physiol.* 27, 571-578.
- Stanley-Samuels, D.W., Dadd, R.H., 1984. Polyunsaturated fatty acids in the lipids from adult *Galleria mellonella* reared on diets to which only one unsaturated fatty acid had been added. *Insect Biochem.* 14, 321-327.
- Stanley-Samuels, D.W., Loher, W., 1983. Arachidonic and other long-chain polyunsaturated fatty acids in spermatophores and spermathecae of *Teleogryllus commodus*: significance in prostaglandin-mediated reproductive behavior. *J. Insect Physiol.* 29, 41-45.
- Stanley-Samuels, D.W., Ogg, C.L., 1994. Prostaglandin biosynthesis by fat body from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 481-491.
- Stanley-Samuels, D.W., Jurenka, R.A., Blomquist, G.J., Loher, W., 1986. *De novo* biosynthesis of prostaglandins by the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 85, 303-307.
- Stanley-Samuels, D.W., Jensen, E., Nickerson, K.W., Tiebel, K., Ogg, C.L., Howard, R.W., 1991. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1064-1068.
- Toolson, E.C., Ashby, P.D., Howard, R.W., Stanley-Samuels, D.W., 1994. Eicosanoids mediate control of thermoregulatory sweating in the cicada, *Tibicen dealbatus* (Insecta: Homoptera). *J. Comp. Physiol. B* 164, 278-285.
- Van Kerkhove, E., Pirotte, P., Petzel, D.H., Stanley-Samuels, D.W., 1995. Eicosanoid biosynthesis inhibitors modulate basal fluid secretion rates in the Malpighian tubules of the ant, *Formica polyctena*. *J. Insect Physiol.* 41, 435-441.
- Yajima, M., Takada, M., Takahashi, N., Kikuchi, H., Natori, S., Oshima, Y., Kurata S., 2003. A newly established *in vitro* culture using transgenic *Drosophila* reveals functional coupling between the phospholipase A₂-generated activation of the immune deficiency (imd) pathway in insect immunity. *Biochem. J.* 371, 205-210.