발 간 등 록 번 호
11-1541000-001700-01

해충의 *yellow* 유전자의 신규기능구명 및 해충 큐티클 맞춤형 방제법 개발 기반연구

Determination of novel biological functions of insect *yellow* gene family in cuticle development and its potential applications for pest insect control

전 남 대 학 교

농 림 수 산 식 품 부

요 약 문

Ⅰ. 제 목

해충의 *yellow* 유전자의 신규기능구명 및 해충 큐티클 맞춤형 방제법 개발 기반연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제는 저곡해충인 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)를 연구모델로 곤충 큐티클의 색소침착(pigmentation) 및 경화(sclerotization, hardening) 과정에 중요한 기능을 하는 것으로 추정되는 *yellow*(dopachrome conversion enzyme) 유전자 family의 기능 연구를 수행하고자 하였다. **해충을 방제하기 위하여 많은 노력이 이루어지고 있으나 곤충의 생존에 필수 과정인 생장, 발생 등을 이용한 해충 방제법은 아직 연구되고 있지 않다. 곤충의 큐티클 형성과정은 곤충의 생장 및 발생에 필수 과정 중의 하나이므로 이를 잘 이해하고 연구하는 것은 해충을 선택적이고 친환경적으로 방제하기 위한 기초지식을 제공할 수 있을 것이다.** 따라서 본 연구에서는 해충방제 후보 유전자를 탐색하기 위하여, 곤충의 색소침착(pigmentation)과 경화(sclerotization) 과정에 중요한 역할을 하는 *yellow* 유전자의 신규 기능을 밝히고 해충 방제 타깃 유전자를 탐색하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

yellow 유전자는 멜라닌 생합성 과정에 관여하여 색소침착(pigmentation)와 멜라닌화(melanization) 반응을 촉진 하는데 중요한 역할을 한다. **현재까지 초파리에서 14개의 *yellow* 유전자군이 밝혀졌으며, 최근 연구결과 중 DmY-y가 멜라닌 생산에 중요한 역할을 하는 것이 보고되었으나, 나머지 *yellow* 유전자의 정확한 생리학적 기능에 대해서는 여전히 밝혀진 바 없다.**

이에 본 연구에서는 *Tribolium*에 존재하는 14개의 *yellow* 유전자 중, 곤충의 생장과 발생 및 큐티클 형성과정에 중요한 유전자를 RNAi 기법을 이용하여 탐색하고 해충방제제 후보 유전자를 발굴하고자 다음과 같은 목표를 세웠다.

1. *yellow* 유전자의 발생과정 동안 모든 *yellow* 유전자 발현 양상을 밝힘

2. RNAi를 기반으로 한 잠재적 해충방제 타깃 *yellow* 유전자 탐색 및 발굴.

Ⅳ. 연구개발결과

곤충의 큐티클 형성과정의 연구를 통하여 해충방제 후보 유전자를 탐색 및 발굴을 위하여, 먼저 *Trbolium*의 큐티클 색소침착(pigmentation)과 경화(sclerotization)에 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 13개 *yellow* 유전자들의 발생과정동안의 발현 양상을 분석하였다. 13개의 *yellow* 유전자들 중에서 어떠한 유전자가 곤충의 생장, 발생, 생존에 중요한지를 탐색하기 위하여, 유전자 발현양상 분석 결과에 따라 dsRNA를 주사에 적절한 시기를 결정하고, RNAi를 통한 표현형의 변화나 치사율을 조사하였다. 이를 통하여 일부 *yellow* 유전자(*TcY-d*, *TcY-e*, *TcY-f, TcY-g, TcY-g2*)가 RNAi 후 탈피 실패, 탈수 현상, 산란율 저하와 같은 표현형을 관찰 할 수 있었다. 예를 들면, *TcY-d*와 *TcY-f*의 dsRNA를 유충시기에 주사한 결과 번데기가 성충으로 탈피를 하지 못하고 죽는 것을 확인하였다. *TcY-e* 유전자를 RNAi 한 경우에는 약 20%가 탈피를 하지 못하고 치사하는 것을 보여주었고, 나머지는 80%는 성충으로 탈피할 수 있지만

빠른 시간 내에 치사하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 난소(ovary)에 주로 발현되는 *TcY-g*와 *TcY-g2*의 경우, parental RNAi를 통하여 ds*TcY-g*와 ds*TcY-g2*를 주사한 성충이 산란하는 동안 알이 산란관을 통과하면서 파괴되어 산란을 하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. **본 연구를 통하여, 13개의 *yellow* 후보 유전자 중 높은 치사율을 보여주는 *TcY-d, TcY-e, TcY-f, TcY-g*와 *TcY-g2*가 해충방제 후보 유전자로 이용 가능할 것으로 확인할 수 있었다.**

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 수행을 통하여 곤충의 큐티클의 색소침착(pigmentation), 경화(sclerotization) 및 안정화(stabilization)에 관여하는 다양한 *yellow* 유전자의 새로운 생물학적 기능을 밝혀 **곤충의 큐티클 형성과 성숙의 기작을 이해하는 기초자료를 제공할 수 있을 것이다.**

곤충 큐티클 형성 억제 가능한 유전자를 타깃하여 환경이나 곤충 이외의 생물에 해로움을 최소화 할 수 있는 선택적인 해충 방제제와 새로운 해충 방제제 후보 유전자를 발굴 및 신규 원천 기술 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY
(영문요약문)

Ⅰ. Title (제목)

Determination of novel biological functions of insect *yellow* gene family in cuticle development and its potential applications for pest insect control

Ⅱ. Research objectives and significance (연구개발의 목적 및 필요성)

This proposal describes a comprehensive functional genomics study of members of the insect ***yellow* (dopachrome conversion enzyme, DCE) gene family** and their roles in cuticle pigmentation (coloration) and sclerotization (hardening) using the red flour beetle, ***Tribolium castaneum*** (***Tc***), as the model insect species. **To control pest insect, it is essential to understand insect physiology which is important for their growth, development and survival. Cuticle formation is one of the critical processes for insect development and survival. In this research project, we have studied and identified the novel functions and roles of the *yellow* genes in cuticle development (pigmentation, sclerotization and stabilization) for the pest insect control.**

Ⅲ. Research contents and range (연구개발 내용 및 범위)

Yellow has known to be involved in the melanin biosynthetic pathway and significantly accelerates pigmentation and melanization reactions. In *Drosophila melanogaster* (*Dm*), for instance, 14 genes have been annotated as members of the *yellow* gene family, and recent studies suggest that ***yellow* is a rapidly evolving gene family generating functionally diverse paralogs. However, the exact physiological functions of *yellow* genes are still not understood.**

In this proposal, we have carried out double stranded-RNA mediated gene silencing (RNAi) for *yellow* family genes in *Tribolium* and identified some of them exhibited lethal phenotypes after RNAi. **Because of those *yellow* genes play critical roles in rigidity and stabilization of the cuticle and eggshell that are essential for insect growth and development, they are great target genes for pest insect control.**

Objective 1: Determine The Temporal Developmental Patterns of Expression of *Yellow* Genes
Objective 2: RNAi-based Target Gene Screening for Pest Insect Control

Ⅳ. Results of the research (연구개발결과)

To identify the potential candidate *yellow* gene(s) for control the pest insects, we first analyzed the temporal developmental expression patterns (from embryo through adult) **of all thirteen *yellow* genes in *Tribolium*. To screen the *yellow* genes that are critical for insect growth, development and survival, we injected dsRNAs (RNAi) for each *yellow* gene into the appropriate developmental stage according to their expression profiles, followed by** observed any phenotipic changes and/or lethality. We observed that some of *yellow* genes such as *TcY-d*, *TcY-e*, *TcY-f*, *TcY-g* and *TcY-g2*, showed

high mortality after RNAi. For example, injection of dsRNA for *TcY-d* and *TcY-f* into larvae, the resulting pupae failed to molt to adult. RNAi for *TcY-e,* some of the pupae (~20%) could not molt to adults. In addition, the resulting adults rapidly became desiccated and died. Furthermore, injection of dsRNAs for *TcY-g* and *TcY-g2,* ovary specific *yellow* genes, into adult females (parental RNAi), affected on fecundity. The eggs from the females treated with ds*TcY-g* or ds*TcY-g2* seemed to collapse in their lateral or common oviduct resulting in no eggs were obtained. **Our results indicate that *TcY-d, TcY-e, TcY-f, TcY-g* and *TcY-g2* are great target genes for the pest insect control.**

Ⅴ. Research achievement and application plan (연구성과 및 성과활용 계획)

Work supported by this proposal will reveal novel functional roles of insec*t yellow* genes in cuticle/eggshell pigmentation, sclerotization and stabilization. In addition, the knowledge gained from this proposal will provide fundamental understanding of mechanisms of insect cuticle/eggshell formation and maturation, and could **open up new strategies for selective pest insect control and develop novel bio-insecticides, which target cuticle biochemistry with minimizing detrimental effects on the environment and non-target insects.**

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Outlines of research project ---------- 8
1.1. Project description
1.2. Necessity and Significance of Research
1.3. Long-term goal
1.4. Research Objectives and Contents

Chapter 2. Status of our research the related researches inside and outside Korea -13

Chapter 3. Research contents and results ----------14
3.1. Research range and methods
3.2. Results of the research

Chapter 4. Achievement and contribution of the research ----------25

Chapter 5. Research archivement and Application ----------26
5.1. Research achievements
5.2. Expected advances
5.3. Apply to pest insect control

Chapter 6. References ----------31

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- 8
1.1. 연구 배경
1.2. 연구의 필요성 및 중요성
1.3. 최종 목표
1.4. 연구의 목표 및 내용

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 13
2.1. 국내외 연구 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 14
3.1. 연구범위 및 연구수행 방법
3.2. 연구의 내용 및 결과
3.2.1. *Tribolium*와 *Drosophila*에서 Yellow 단백질 계통분석
3.2.2. RT-PCR과 real-time PCR을 통한 *yellow* 유전자의 발현양상 분석
3.2.3. RNAi 기반 해충방제 후보 유전자 탐색
3.2.4. *TcY-f*와 *TcY-d* 유전자의 RNAi에 따른 번데기에서 성충으로의 탈피 실패
3.2.5. 난소 특이적 발현 yellow 유전자, *TcY-g*와 *TcY-g2*

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 25

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ---------- 26
5.1. 연구개발 성과
5.2. 기대성과
5.2.1. 학문적, 인력양성 측면
5.2.2. 기술적, 경제·산업적 측면
5.3. 연구개발결과의 해충방제에 응용

제 6 장 참고문헌 ---------- 31

제 1 장 연구개발과제의 개요

1.1. Project description (연구 개요)

본 연구 계획서는 곤충의 큐티클(cuticle) 및 난각(eggshell)의 색소침착(pigmentation) 및 경화작용(sclerotization) 에서 중요한 곤충의 *yellow*(dopachrome conversion enzyme) 유전자군의 역할 및 기능을 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*) 모델에서 유전체학적 연구 방법을 이용하여 포괄적으로 연구하기 위한 것이다.

아래 그림에서 보는 바와 같이 곤충의 외골격의 색깔이나 형태 등은 매우 다양하므로 이러한 곤충의 특성은 생물의 진화와 발생을 연구하는데 많이 이용되고 있다. 곤충의 외골격의 다양한 형태와 색깔은 색소침착(pigmentation) 과정에 의한 결과이며, 이러한 곤충 체색의 특징을 이용하여 과거 뿐 만 아니라 현재에도 생물의 진화와 발생을 연구하는데 많이 이용하고 있다. 곤충의 색소 생합성은 표피세포(epidermal cell)에서 이루어지고 큐티클의 색소 침착이나 무늬 형성은 발생과정동안에 매우 필수적인 과정일 뿐 만 아니라 곤충은 방어 행동이나 면역과 같은 다양한 측면에 영향을 주기도 한다. 또한 곤충의 이러한 놀랄 만큼의 다양한 체색과 무늬를 가지고 있어 곤충 수집가들과 학생들이 많은 관심을 갖게 하는 원인 중에 하나이다. 또한 왜 이러한 다양성이 형성되었는지에 대한 흥미를 불러일으키기도 한다(**Fig. 1**). 따라서 **곤충 큐티클의 색소침착(pigmentation)에 대한 많은 연구는 생태학, 발생학, 유전학, 분자생물학, 생화학 및 생리학을 비롯한 생물학의 다양한 분야에 새로운 식견을 제공하고 있다.**

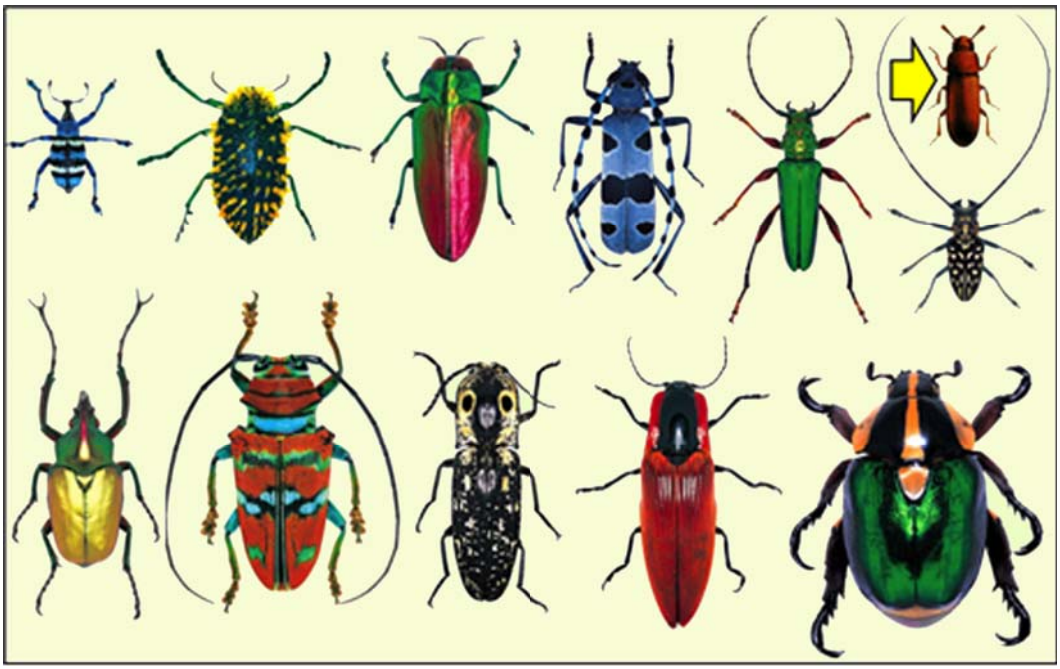


Fig. 1. Beetle diversity. Beetles **(**Coleopteran) as the most species-rich eukaryotic evolute distinct and unique body color diversity that is powerful tool for studying insect ecology, development, genetics, molecular biology and physiology. **Yellow arrow indicates our model insect, the red flour beetle, *Tribolium castaneum*** (노란화살표가 본 연구의 연구모델 **거짓쌀도둑거저리**)

곤충의 큐티클(cuticle)/외골격(exoskeleton)은 외부환경으로부터 내부조직을 보호하거나 수분손실을 방지하는 등의 역할을 하여 곤충이 지구상에서 가장 잘 적응할 수 있게 된 중요한 요인이다. 곤충 큐티클의 구조는 수분 증발 방지층인 외막층(envelope), 단백질을 많이 함유하고 있는 외표피층(epicuticle), 그리고 키틴질로 이루어진 두꺼운 층인 원표피층(procuticle)으로 이루어져 있다(Barnard, 2010). 키틴 섬유가 카테콜에 의해 교차 연결된 단백질들과 네트워크를 형성하고 있는 원표피층(procuticle)은 탈피 전에 만들어지는 외원표피층(exocuticle)과 탈피 후 주로 형성되는 내원표피층(endocuticle) 층으로 나눌 수 있다. 곤충은 탈피 직후에 매우 하얗고 부드러운 큐티클을 가지고 있으나 곤충의 생장, 발생 및 생존에 필수 과정인 색소침착(pigmentation)과 경화(sclerotization), 즉 tanning 과정에 의하여 큐티클이 매우 신속하게 단단하고 어두운 색깔을 가지게 된다. 이러한 곤충의 생존에 필수인 큐티클 형성과정이 어떻게 일어나는지에 대한 이해와 연구는 매우 흥미롭고 중요하다고 할 수 있다.

색소침착(pigmentation)은 곤충에게 매우 중요한 생리적 과정으로 큐티클 tanning 뿐만 아니라 난각(egg-shell)의 견고화, 눈과 말피기소관의 착색, 상처 치유나 미생물의 캡슐화와 같은 생체 방어 반응과도 매우 밀접하게 관련되어 있다(Li,1994; Sugumaran, 2002; Andersen, 2010). 멜라닌화(Melanization)는 곤충의 색소침착(pigmentation)의 한 유형으로 아래의 그림(**Fig. 2**)과 같은 효소 반응 단계를 거쳐 합성된다. 이 반응은 tyrosine이 dihydroxyphenylalanine (dopa)로 수산화(hydroxylation)되는 반응에 의하여 개시된다. dopa를 dopaquinone으로 산화시킨 후 dopaquinone을 dihydroxyindole(DHI) 또는 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)로 전환시키고 DHI-chrome과 DHICA-chrome(melanochrome)으로 산화시켜 melanochrom을 dopa-melanin으로 합성하는 과정이다(Simon et al., 2009). 이러한 일련의 과정들을 곤충의 큐티클 **tanning 과정**이라고 하며, 이때 몇 가지 중요한 효소들이 이 반응에 관여하게 된다. 즉, **tyrosine hydroxylase(TH)**가 tyrosine을 dopa로, **dopa decarboxylase (DDC)**가 dopa를 dopamine으로, **laccase 2**가 dopa, dopamine, DHI를 각각 dopaquinone, dopamine-quinone, melanochrome으로 산화시킨다(**Fig. 2**) (Arakane et al., 2005, 2009; Gorman and Arakane, 2010; Andersen, 2010).

위와 같이 곤충의 tanning 과정에서 Yellow 단백질은 멜라닌 생합성 과정에서 pigmentation과 melanization을 크게 촉진시키는 것으로 알려져 있다(**Figs. 2, 3, 4**) (Arakane et al., 2010, 2009). 최근 보고된 연구 결과에 따르면 *yellow* 유전자들은 매우 빠르게 진화된 유전자 군으로 기능적으로 다양한 유사그룹을 가지고 있다. 초파리의 경우 14개의 *yellow* 유전자가 밝혀진 바 있으며, 그 중 *yellow-y*(DmY-y)가 멜라닌 생산을 촉진시키는 것으로 보고되었고, 또한 초파리의 Yellow-y mutant를 분석 한 결과 큐티클의 dark pigmentation 부위에서 Yellow-y 단백질이 중요한 역할을 하는 것을 확인 할 수 있었다(**Fig. 3, right panels**) (Drapeau et al., 2001; Wittkopp et al., 2002a, b, 2003; Prud'homme et al., 2007). DmY-y의 mutant와 유사하게 누에나방의 *yllow-y*(*BmY-y*) 유전자도 큐티클의 black pigmentation된 부위에 발현되며(Futahashi et al., 2008), BmY-y mutant의 경우 노란색의 체색을 보여주는 것을 확인하였다(**Fig. 3, left panels**). 이를 통하여, 곤충의 yellow-y가 정상적인 큐티클의 체색을 띄는데 관여한다는 것을 알 수 있었으나 ***yellow-y*를 제외한 나머지 *yellow* 유전자들의 정확한 생리적인 기능은 여전히 잘 알지 못한다.**

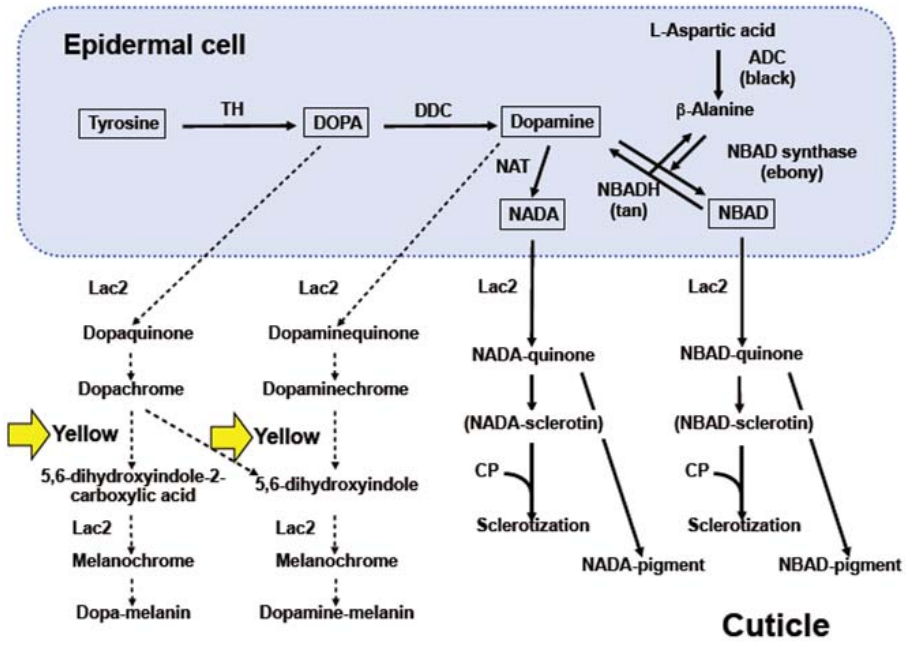


Fig. 2. Proposed cuticle pigmentation and sclerotization metabolic pathway in *T. castaneum*. TH = tyrosine hydroxylase, DOPA = 3,4-dihydroxyphenylalanine, Dopamine = 3,4-dyhydroxyphenethylamine, DDC = dopa decarboxylase, NADA = N-acetyldopamine, NBAD = N-β-alanyldopamine, ADC = aspartate 1-decarboxylase, Ebony = N-β-alanyldopamine synthase, NBADH = N-β-alanyldopamine hydrolase, Yellow = dopachrome conversion enzyme, Lac2 = laccase2 and CP = cuticle protein(s). **Yellow accelerates the conversion of dopachrome and dopaminechrome to DHI and DHICA during melanization of insect cuticle** (Arakane et al., 2009).

본 연구는 "**곤충 큐티클 색소침착과 경화작용에 관여하는 *yellow* 유전자가 매우 다양하게 분화된 것은 이들 유전자들의 기능이 매우 다양하고 세분화 되었을 것이다**"라는 가설을 세우고 연구를 수행하였다. ***Tribolium*에서 큐티클 및 난각 색소침착, 경화과정, 안정화 뿐 만 아니라, 곤충의 생장과 발생에 매우 중요할 것으로 사료되는 *yellow* 유전자들을 RNAi 기법을 통하여 해충 방제에 적합할 것으로 보이는 타깃 유전자 발굴 및 탐색하고자 하였다.**

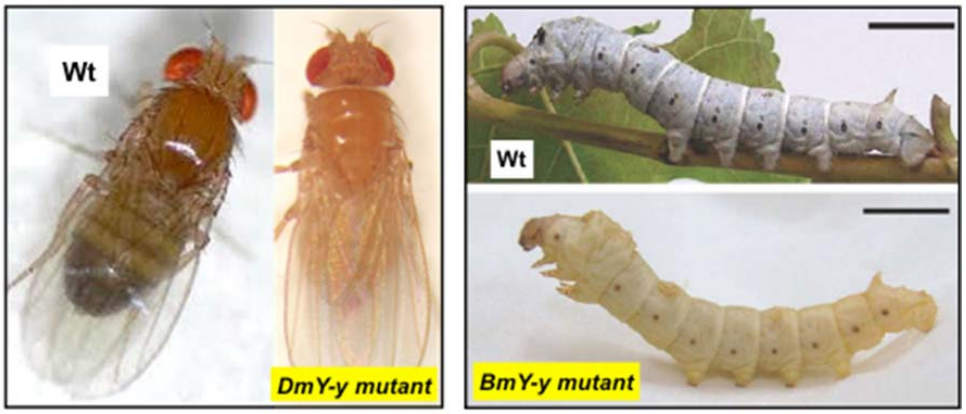


Fig. 3. *D. melanogaster* and *B. mori yellow-y* mutants. *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori yellow-y* mutants exhibit lighter body color (yellowish) than that of wild types, indicating *yellow-y* is required for normal body color pattern in both species (Wittkopp et al., 2007; Futahashi et al., 2008).

1.2. Necessity and Significance of Research (연구의 필요성 및 중요성)

*Tribolium castaneum*의 유전체 분석을 통하여 본 연구자는 *DmY-y*의 ortholog를 포함한 14개의 yellow-like protein을 확보한 바 있다(**Fig. 6**). RNAi 방법을 이용하여 *Tribolium yellow-y*(*TcY-y*)의 기능을 연구한 결과 초파리와 누에나방의 *yellow-y* mutant가 비정상적인 체색을 가지게 되는 것(**Fig. 3**)과는 다르게 *TcT-y*의 유전자 침묵 수행시 *T. castaneum*은 여전히 정상적인 체색을 가지고 있음을 확인 하였다(**Fig. 4A**) (Arakane et al., 2010). 그러나 ds*TcY-y*를 처리한 *T. castaneum* 뒷날개(hindwing)의 연문(pterostigma) 주위 어두운 색소침착(black pigmentation)이 현저히 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 이를 통하여, TcY-y가 *Tribolium* 큐티클 전체의 색소침착이 아니라 단지 뒷날개의 어두운 색소침착(black pigmentation)된 부위에만 멜라닌 생합성 과정에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

TcY-y가 black pigment 생산에 중요한 역할을 하는지를 알아보기 위하여, 본 연구자는 *aspartate 1-decarboxylase* (*ADC*) mRNA의 발현이 낮아 dopamine이 비정상으로 많이 생성되어 큐티클이 멜라닌화된 *black* body color mutant (Arakane et al., 2009)를 이용하여 TcY-y의 dsRNA를 주사한 후 표현형을 관찰하였다. 그 결과 매우 흥미롭게도 *black* body color mutant에서도 hindwing을 제외한 성충의 큐티클 색소침착에 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였다(**Fig. 4B**). **이러한 결과로 TcY-y는 black mutant에서 큐티클의 black body pigmentation에 중요한 역할을 하지 않을 것으로 추정할 수 있다.** 아마도 *yellow* 유전자들 중 다른 *yellow* 유전자가 멜라닌 생산에 관여하거나 또는 비정상적으로 많은 양의 dopamin과 dopamine- quinone이 자동으로 5'6'-dihydroxyindole (DHI)으로 전환시켜 충분한 dopamine-melanin을 생산하여 체색을 갈색에서 검게 변화시키는 것으로 사료된다.

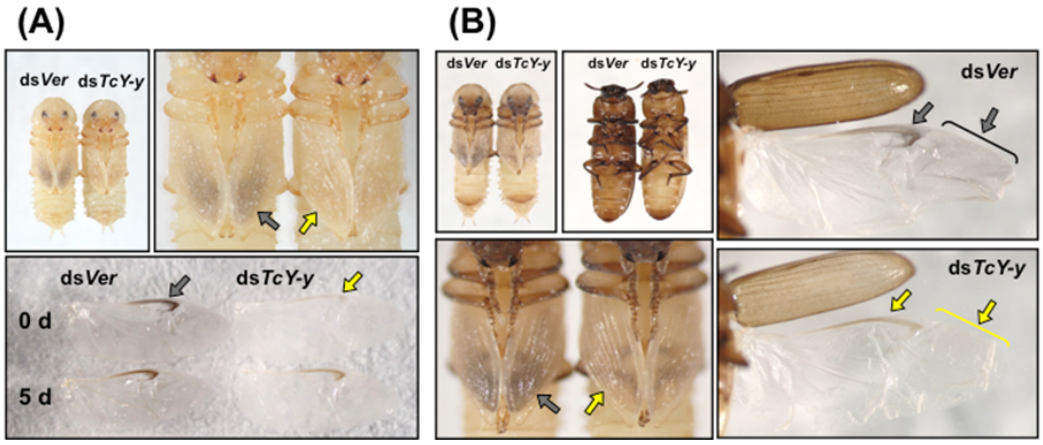


Fig. 4. Effect of dsRNA for *Tcyellow-y* on cuticle pigmentation. (A) To study the functions of *TcY-y*, dsRNA for *TcY-y* was injected into 0-1 d old pupae (wild-type GA-1 strain). Injection of ds*TcY-y* had no effect on pupal development or pupal-adult molting. A normal level of adult cuticle pigmentation was observed except for pigmentation in the pterostigma of the hindwings (yellow arrows). ds*TcY-y* injection caused significant defects and a delay in the pigmentation of this region (Arakane et al., 2010; Tomoyasu and Arakane et al., 2009). (B) A similar RNAi experiment for *TcY-y* was carried out using the black body color mutant in which levels of aspartate 1-decarboxylase (*TcADC*) mRNA are drastically reduced and dopamine content is substantially increased, the latter which is utilized for production of dopamine-melanin. There was no effect on adult cuticle pigmentation except for that which occurred in the pterostigma of the hindwings (Arakane et al., 2010).

본 연구에서 *Tribolium yellow* 유전자를 RNAi한 결과, ***TcY-d*와 *TcY-f* 유전자의 경우 성충으로 탈피하지 못하고 결국에는 죽는 것을 확인하였고, 이는 일부 *yellow* 유전자들이 큐티클의 체색에 중요한 역할을 하는 것 보다는 큐티클의 경화에 더욱 중요한 역할을 하는 것으로 추정할 수 있었다(Fig. 9, 10). 따라서 본 연구에서는 RNAi를 통하여 곤충의 생장과 발생에 영향을 주어 치사 표현형을 보여주는 *yellow* 유전자를 탐색하고 해충방제 후보 유전자로서의 가능성을 제시하고자 한다**

1.3. Long-term goal (최종 목표)

본 연구에서는 농해충을 방제하기 위하여 RNAi 기법을 이용하여 잠재적 해충방제 후보 유전자를 발굴 및 탐색하고자 하였다. 곤충의 큐티클 색소침착(pigmentation), 경화(sclerotization)와 안정화(stabilization)에 관여하는 *yellow* 유전자들이 다양하게 존재하는 것은 이들 유전자의 기능이 매우 분화되고 전문화되었을 것을 잘 반영해주고 있다. 본 책임연구자에 의하여 이들 *yellow* 유전자들의 독립적으로 조절되고 발생과정동안, 조직특이적인 발현 양상이 매우 독특함을 보고한 바 있다(Arakane et al., 2010). 따라서 각각의 *yellow* 유전자들의 생물학적, 생리학적 기능을 밝히고 큐티클 및 난각의 착색과정, 견고화, 안정화에 대한 역할을 이해하는 것은 큐티클 형성과 진화에 대한 분자적인 기작을 이해하기 위한 지식을 넓힐 수 있을 것이다.

본 연구에서는 *yellow* 유전자가 곤충의 큐티클 형성 및 생장과 발생에 매우 중요한 역할을 하므로, RNAi 후 치사율이 높은 *yellow* 유전자를 탐색하여 해충을 방제제로 이용할 수 있는 후보 유전자를 밝히고 그 기능을 연구하고자 하였다.

본 연구를 통하여 얻은 결과는 곤충 큐티클 형성 및 성숙 과정을 더 깊이 이해할 수 있을 것이며, 농해충을 선택적이고 친환경적인 해충방제를 위한 새로운 전략과 후보 유전자를 확보하고 이용하는데 기초 지식을 제공 할 수 있을 것이다.

1.4. Research Objectives and Contents (연구의 목표 및 내용)

Objective 1: 발생과정동안 *yellow* 유전자의 발현 양상 조사

유전자 특이적인 RNAi 후 치사하는 유전자를 탐색하기 위하여, 각 *yellow* 유전자의 각 발생과정 및 조직 특이적 발현양상을 확인하여, 이결과를 통하여 dsRNA를 주사의 적합한 시기결정하고, 생화학적 형태적 변화가 있을 조직을 예측할 수 있었다. 모든 *yellow* 유전자를 *Tribolium*의 전 생활사인 알부터 성충시기까지 발현양상을 real-time PCR을 통하여 조사하였다. 여기서 얻은 결과는 objective 2를 수행하기 위하여 이용하였다.

Objective 2: RNAi 기반 해충 방제 후보 물질 탐색

Yellow 단백질을 암호화하는 유전자들은 큐티클 pigmentation 기능 이외의 다양한 기능을 가진 다양한 유전자 집단으로 진화하였다. *TcY-d* 와 *TcY-f* 유전자와 같이 일부 다른 *yellow* 유전자들 역시 곤충의 생장과 발생에 중요한 역할을 할 것이다. *Tribolium*에서 14개의 *yellow* 유전자들을 확보한 바 있으나, *yellow-y*를 제외한 13개의 *yellow* 유전자들 중 곤충의 생장과 발생에 중요한 역할을 하는 유전자를 확보하고자 하였다. 이를 위하여 RNAi 기법을 이용하여 다양한 *yellow* 유전자들 중 해충을 방제하는데 유용한 후보 유전자들을 탐색 및 발굴하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

2.1. Status of our research the related researches inside and outside Korea (국·내외 연구 현황)

곤충의 큐티클 형성과정을 이용한 해충 방제에 대한 보고는 국내 뿐 만 아니라 국외에서도 연구되어진 바 없다. 친환경 농해충을 방제하기 위하여 많은 시도들이 있으나 곤충의 발생과 생장을 이용한 해충 방제의 시도는 거의 이루어지고 있지 않다. 본 연구는 곤충의 발생과 생장의 필수 과정인 곤충의 큐티클 형성 과정, 탈피, 알의 성숙화 과정 등의 연구를 통하여 해충을 방제할 수 있는 기초지식을 제공하고자 하였다. 본 연구를 통하여, 곤충의 큐티클 형성과정에 관여하는 *yellow* 유전자의 기능을 밝히고, 그중 일부 *yellow* 유전자가 해충을 방제하는데 이용할 수 있는 후보 유전자가 될 수 있음을 확인하였다. 곤충의 큐티클/난각 형성 과정에 중요한 *yellow* 유전자의 기능을 이해하는 것은 농해충 및 위생해충을 방제하기 위한 새로운 생물학적 방제제를 개발하는데 응용할 수 있는 기초 지식을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

Research facility (연구 수행 기관)	Accomplishment related with this proposal (본 연구 관련 연구 결과 보고)
미국 캔사스주립대학 생화학과 (Arakane et al., IBMB, 2010)	- *T. castaneum* (거짓쌀도둑거저리) 모델곤충에서 14개의 *yellow*-like genes 클로닝 및 염기 서열을 분석하였으며, 발생후기과정(종령유충이후)에서 발현양상을 분석함.**(Fig. 7, 8)**. - *T. castaneum yellow-y* 유전자를 RNAi 방법으로 gene silencing한 결과, 초파리(DmY-y)와 누에(BmY-y)와 다르게 *Tribolium*의 성충 body pigmentation에 영향을 주지 않음**(Fig. 4)**. - 그러나 뒷날개의 pterostigma pigmentation과 그 주위에 영향을 주어 검은색(black)이 거의 무색의 표현형을 관찰함**(Fig. 4)** - ***TcY-d, TcY-f* 및 *TcY-e*를 RNAi 한 결과 번데기에서 성충으로 탈피에 실패(Fig. 9, 10).** - ***TcY-g*와 *TcY-g2*는 주로 성숙한 성충의 난소에서 발현함을 확인하였고, 이는 TcY-g와 TcY-g2가 알을 견고하게 하는데 필수적인 것으로 추정 할 수 있음(Fig. 14).**
(USA) 미국 미시간 대학 (Wittkopp et al., Development, 2002a, Wittkopp et al., Curr Biol, 2002b)	- 초파리의 pigmentation 유전학과 진화학적 관점에서 연구. - 초파리의 *DmY-y* gene은 normal body color에 중요함.
미국 위스콘신대학교 분자생물학연구실 (Prud'homme et al., PNAS, 2007)	- 초파리의 날개 발달 및 pigmentation patterns에 대한 유전학적 연구 수행. - 초파리의 *DmY-y* gene는 normal body color에 중요함.
일본 동경대학교 농업환경생물학과 (Ito et al., JBC, 2010)	- 누에(*Bombyx mori*)의 pigmentation 의 유전학적 연구 수행. - *BmY-y* gene 는 normal body color 에 중요함. - 누에의 유충에서 *BmY-e* gene 역시 normal color pattern에 중요함을 밝힘. - 호랑나비(*Papilio xuthus*)에서 *yellow-y*와 같은 색소 합성에 관여된 유전자가 ecdysteroid에 의하여 조절됨을 밝힘.
미국 뉴욕대학교 생물학과 (Drapeau et al., Genome Res, 2006b)	- 꿀벌에서 Yellow/Major Royal protein family의 진화학적 연구
중국 베이징 Chinese Academy of Agricultural Sciences (Xia et al., BMC Genomics, 2006)	- 누에의 *yellow* family gene의 생물정보학적 연구.
미국 캘리포니아대학 분자생화학과 (Amenya et al., Insect Physiol, 2010)	- 프로테오믹스를 통한 모기 *Anopheles gambiae*의 eggshell 단백질이 Yellow-g2임을 밝힘. - RT-PCR 수행 결과 *yellow-g2*가 모기의 난소에 주로 발현 함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

3.1. Research range and methods (연구범위 및 연구수행 방법)

본 연구의 가설인 "Insect *yellow* genes possess multiple diverse functions. Some of *yellow* genes play a key role in cuticle pigmentation, sclerotization and stabilization that are essential for insect growth, development and survival"를 밝히고자, 13개의 *yellow* **유전자의 발생과정동안의 발현 양상을 조사한 후**, RNAi **기법을 이용하여 해충방제 후보 유전자를 탐색하기 위한 연구를 수행하였다**.

***Tribolium casteneum* rearing**

본 연구를 수행하기 위한 연구 모델은 *Tribolium castenume* GA-1 strain (Haliscak and Beeman, 1983)**을 사용하였으며**, **곤충은** 30 °C**에서** 50% **상대습도 조건에서 사육하였다** (Beeman and Stuart, 1990).

Expression patterns of *yellow genes* during development

각 *yellow* gene**들의 발생과정 동안의 발현양상 및 조직특이적 발현 양상을 확인하기 위하여**, *Tribolium***의 알**, **유충**, **전용**, **용**, **성충에서** total RNA**를** RNeasy Mini kit (Qiagen)**을 이용하여 분리하였다**. cDNA**를** oligo-(dT)**와** SuperScript III (Invitrogen)**를 이용하여 합성하였고**, real-time PCR**을 다음과 같은 조건에서 수행하였다**(initial denaturation 95°C**에서** 20**초**, denaturation 95°C**에서** 5**초**, annealing **및** extension 60°C**에서** 20**초**). *TcrpS6* (*ribosomal protein S6*)**를 대조군으로 사용하였으며**, Table 1**에 정리된 프라이머를** real-time PCR **수행에 사용하였다**.

Synthesis and injection of double-stranded RNA for *yellow* genes

DNA **시퀀스를 비교 분석한 후**, *yellow* gene family**들의 각** gene**에만 존재하는 독특한 부위를 확보하여 각** *yellow* gene**의 특별한 부위**(100-500 bp)**에 대하여** T7 promoter **시퀀스를 포함한 프라이머를 제작 후** *yellow* **유전자를** PCR**로 증폭하였다**. *In vitro* transcription kit**과** PCR**로 증폭한** gene **특이적** DNA template**를 이용하여**, **각 타깃** *yellow* gene**의 독특한 부위에 해당하는** dsRNA**를 합성 후 정제하여 이용하였다**. dsRNA (2-200 ng/insect)**를 유충**, pharate pupae, **번데기**, **성충의 복부 배판에 각각의** gene**에 대한** dsRNA**를 주사 후**, **각** gene**에 특이적인 프라이머를 이용한** quantitative RT-PCR**을 수행을 통하여 각** gene**의** mRNA **감소 정도와 특이적으로 발현이 줄어드는지를 확인하였다**. **또한 대조군으로써** Lorenzen **박사**(2002a, b)**가 사용하였던 방법을 이용하여**, *T. castaneum***의** *vermilion***이나** green fluorescent protein(GFP)**의** dsRNA**를 주사하여 각각 특이적이거나 비특이적 대조군**(specific**과** non-specific effects**에 대한** control)**으로 사용하였다**. **각 처리마다**, 20-40**마리의 곤충을 이용하여** 3**번의 반복 실험을 수행하여 형태학적이고 행동학적 특이사항과 변화를 매일 광학 현미경 하에서 관찰하고**, **특히 생장과 발생에 미치는 영향 및 곤충의 큐티클** pigmentation**과** sclerotization**의 변화에 초점을 두어 관찰하였다**.

Table 1. Primers of *yellow* genes for real-time PCR

Yellow genes	Acession number	Primer set for real-time PCR (5' to 3')
TcY-b	GU111762	F: CGGCTTGCGATTCGAAATTGGTGA R: ATGACAAGAACCACTCCTCCCACA
TcY-c	GU111763	F: TGGAAAGCCAACACCCTCCCTAAA R: AGGCCTGTGTCCATTACCCAAAGA
TcY-d	GU111764	F: TCGACAAAGACGGCGTCATGTACT R: TTTCGGGCCGTATTCAGTGTGAGT
TcY-e	GU111765	F: TTCGCTGCTGAATTGCGATGGAAG R: AAGCAACTCTTGGAGCCGTACTGA
TcY-f	GU111766	F: TTCCCTGGAAGCACCAACAACAAC R: AGGATTGGTGTCAGGTCTTTGGGT
TcY-g	GU111767	F: ATGCGAGGCCACCAAGAACATCTA R: GGGCCACAATTGCGTCTTCTTTGA
TcY-g2	GU111768	F: TCAACACTCTCGAGACGCCAATCA R: ATTCCACGGCGATGTATTGCAAGC
TcY-h	GU111769	F: TGCCAGGAGTACGAAGACTTTGGT R: AATGGCAAACGGTTCGACAAGACC
TcY-1	GU111771	F: TTTCAGTCCGTTGTCAAGCCTCCA R: ACGGAGCTGTCGGAGAAATTAGCA
TcY-2	GU111772	F: GACAAAGGCACAAAGCAGGGACAA R: TTCAACAATCGCTGCGGTTTCCAG
TcY-3	GU111773	F: GCCCATCAAGAACCAAACGTTCCA R: TACTTCCGCTTGATGACCGCCTTT
TcY-4	GU111774	F: TTCCATCGTCTACGCAGAAGCCAT R: ATTTGGGCAAAGCGATGTACCACC
TcY-5	GU111775	F: AAGCTGCGAATTTCGTGGTGGATG R: ATCCGGTCAAGGAGCAATACAGCA

Parental RNAi

*Tribolium*의 난소에 특이적으로 발현하는 *TcY-g*와 *TcY-g2* 유전자의 발생과정 및 조직특이적 발현 양상을 PCR을 이용하여 확인하였다. 본 책임연구자는 dsRNA를 성충 암컷에 주사하는 parental RNAi(pRNAi)라는 기술을 발전시킨바 있다(**Fig. 5**). parental RNAi 실험 방법을 이용하여, *TcY-g*와 *TcY-g2*의 dsRNA를 성충 암컷에 주사한 후 산란 수 또는 난황형성과정에 미치는 영향을 조사하였다.

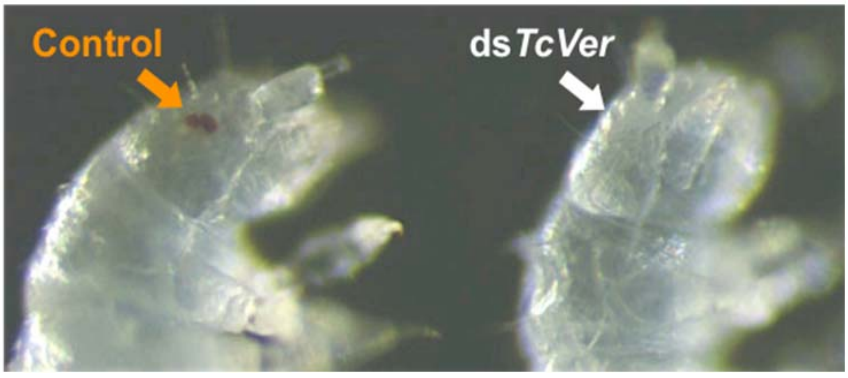


Fig. 5 Parental RNAi of *Tribolium vermilion*. *Tribolium vermilion* (*TcVer*) gene encodes tryptophan oxygenase that catalyzes eye pigmentation in this beetle (red arrow). dsRNA for *TcVer* was injected 1-3 wk old adult females and mated them with non-treated males. Embryos from ds*TcVer*-treated adult females lacked eye pigmentation (white arrow) indicating that dsRNA-mediated parental RNAi are functional in this beetle. (Arakane et al., 2008)

3.2. Results of the research (연구의 내용 및 결과)

해충방제 후보 유전자를 발굴하기 위하여, 먼저 *Trbolium*의 13개 유전자의 발생과정 및 조직특이적 발현 양상을 분석하였다. 유전자 발현양상 분석 결과는 13개의 *yellow* 유전자들 중에서 어떠한 유전자가 곤충의 생장, 발생, 생존에 중요한지를 탐색하기 위한 RNAi를 수행하는데 이용하였다. 유전자 발현 양상 조사 후 dsRNA를 각 적절한 시기에 맞추어 주사한 후 *Triblolium*의 표현형이나 치사율을 조사하였다. 이를 통하여 일부 *yellow* 유전자(*TcY-d*, *TcY-e*, *TcY-f, TcY-g, TcY-g2*)가 RNAi 후 높은 사충율을 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 예를 들면, *TcY-d*와 *TcY-f*의 dsRNA를 유충시기에 주사한 결과 번데기가 성충으로 탈피를 하지 못하고 죽는 것을 확인하였다. *TcY-e* 유전자를 RNAi 한 경우에는 약 20%가 탈피를 하지 못하고 치사하는 것을 보여주었고, 나머지는 80% 성충으로 탈피할 수 있지만 빠른 시간 내에 치사하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 난소에 주로 발현되는 *TcY-g*와 *TcY-g2*의 경우, parental RNAi를 통하여 ds*TcY-g*와 ds*TcY-g2*를 주사한 성충이 산란하는 동안 알이 산란관을 통과하면서 파괴되어 산란을 하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. **본 연구를 통하여, 곤충의 색소침착(pigmentation)과 멜라닌화(melanization)에 중요한 13개의 *yellow* 후보 유전자 중 *TcY-d, TcY-e, TcY-f, TcY-g*와 *TcY-g2*가 곤충의 탈피 저해, 탈수 및 산란율 억제 등의 곤충의 생장 및 발생을 방해하여 높은 치사율을 보여 주어 해충방제 후보 유전자로 이용 가능할 것으로 확인할 수 있었다.**

3.2.1. *Tribolium*와 *Drosophila*에서 Yellow 단백질 계통분석

DmY-y를 쿼리로 Beetlebase(http://beetlebase. org/blast/blast.html)에서 tblastn한 결과 초파리의 DCE의 homologous 단백질을 암호화하는 14개의 *Tribolium yellow* 유전자를 확보할 수 있었다. 계통분석을 통하여 *Dmyellow-b, -c, -e, -g, -g2, -h, -y*를 포함한 대부분의 초파리의 *yellow* 유전자 ortholog가 *Tribolium*에서 확인 되었으나(**Fig. 6**), 초파리는 *yellow-d*와 *–f*를 포함하여 한 개 이상의 subfamily를 가지고 있는 반면에 *T. castaneum*은 subgroup 마다 각 한 개 유전자만을 가지고 있음을 알 수 있었다. 흥미롭게도, *T. castaneum, Apis mellifera* 그리고 *Nasonia vitripennis*가 가지고 있는 Yellow 단백질 중 한 개 분류군이 초파리에서는 발견되지 않았다(**Fig. 6 clade-X)**. 두 개의 초파리 *DmY-g*와 *DmY-g2*의 orthologs인 *T. castaneum TcY-g*와 *TcY-g2*는 8th linkage group에 가장 가까운 것으로 보여진다. 또한 *TcY-3*, *TcY-4*와 *TcY-5* 유전자는 3rd linkage group과 클러스터를 형성하는 것을 확인 할 수 있었다. 이들 두 그룹에 클러스터 되는 것을 제외하고는 다른 *yellow* 유전자들은 *Tribolium* 유전체 전체에 퍼져 있었다. 이들의 각각에 대한 기능 연구는 초파리와 누에나방의 yellow-y를 제외하고는 거의 밝혀진바 없다. 이 *yellow* 유전자 중 RNAi 결과 치사율을 보여주는 *yellow* 유전자들을 탐색하고자 한다.

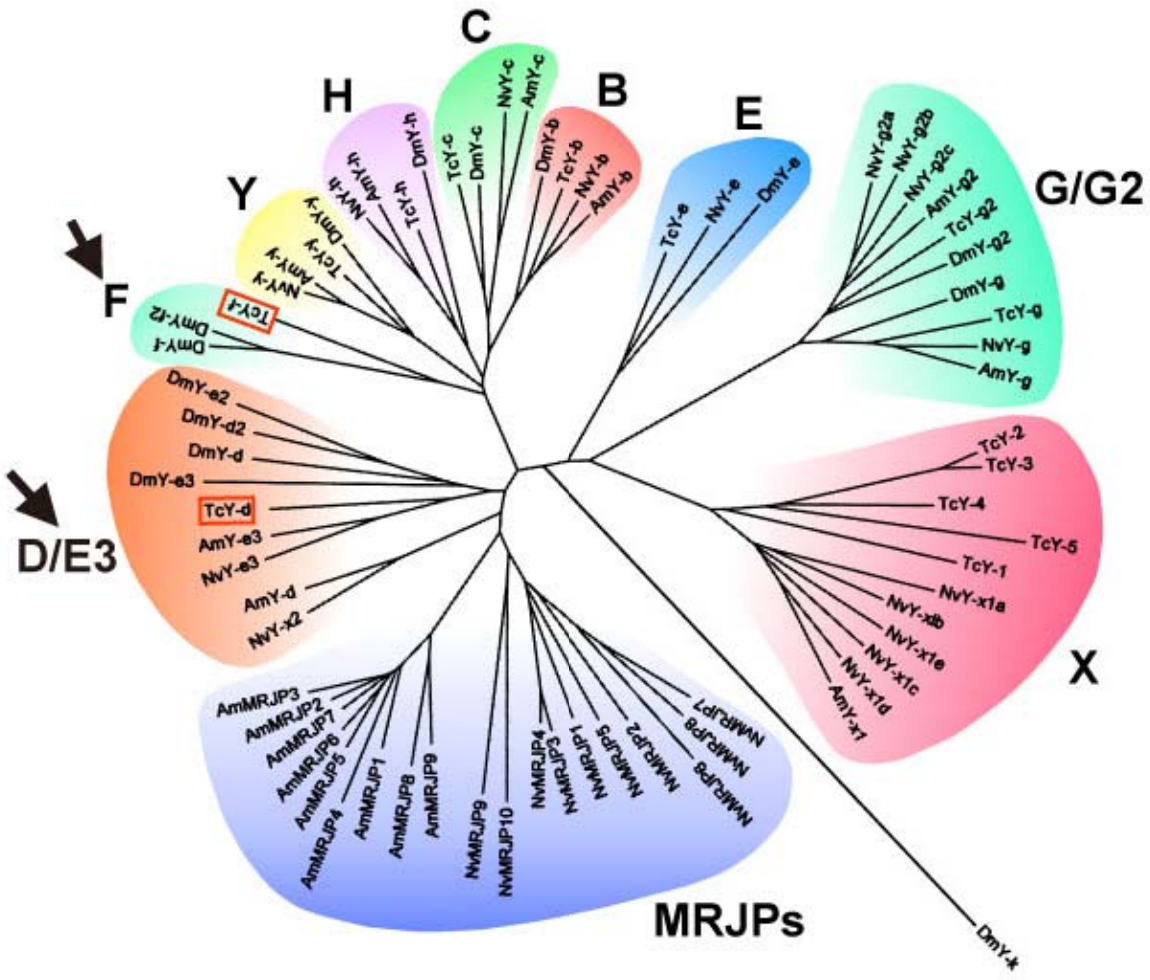


Fig. 6. Phylogenetic analysis of Yellow in *Tribolium* and *Drosophila*. ClustalW software was used to perform multiple sequence alignments prior to phylogenetic analysis. The phylogenetic tree was constructed by MEGA4 software using UPGMA (Tamura et al., 2004). The arrows indicate the Yellow families that are focused on this proposal. Tc, *Tribolium castaneum*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Nv, *Nasonia vitripennis*; Am, *Apis melifera*; MRJP, Major Royal Jelly Protein.

3.2.2. RT-PCR과 real-time PCR을 통한 *yellow* 유전자의 발현양상 분석

전용시기부터 어린 성충시기까지의 발생과정동안에 모든 *yellow* 유전자들의 발현 양상을 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과 *yellow* 유전자들의 발현양상이 매우 다양함을 확인할 수 있었으며, 각 *yellow* 유전자들이 고유의 생리학적 기능을 가지고 있을 것이라고 추정할 수 있었다(**Fig. 7A**).

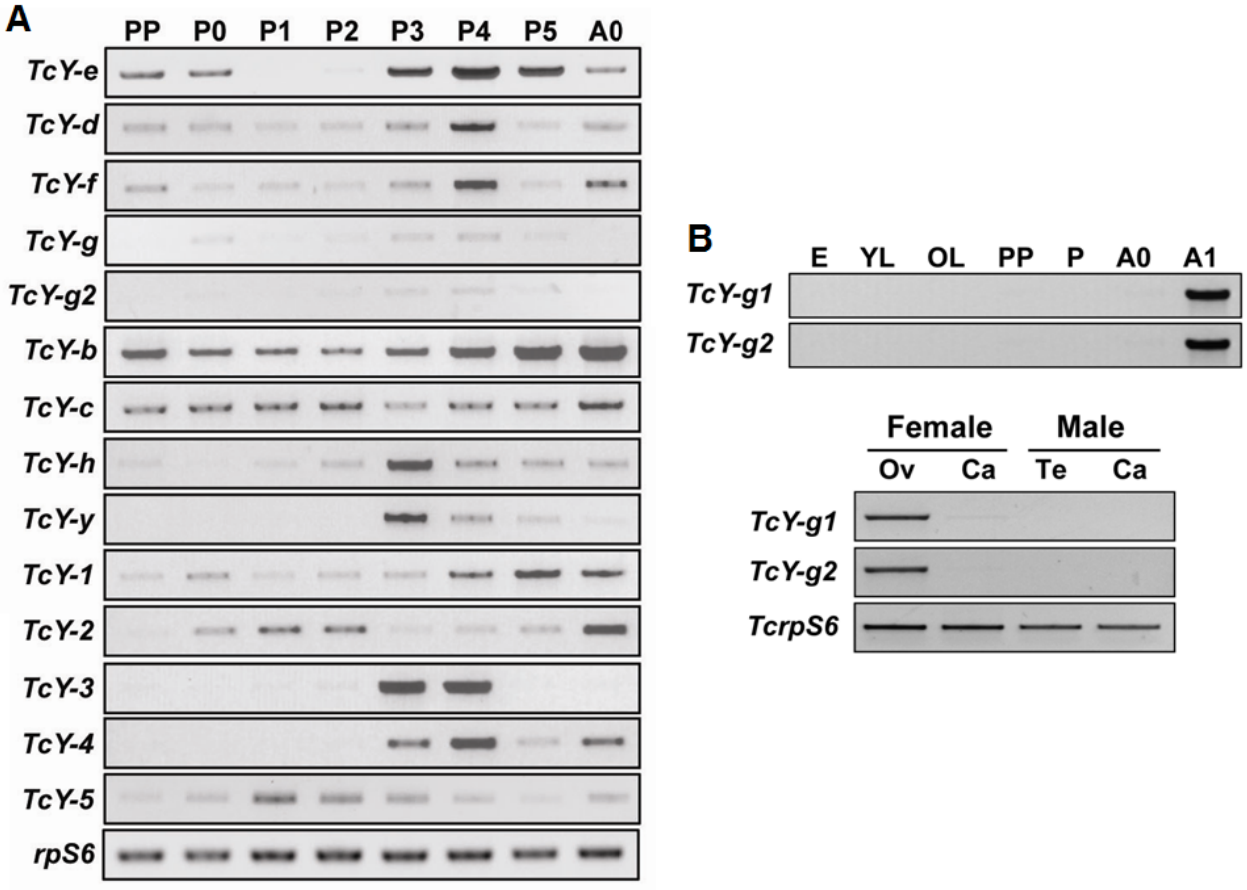


Fig. 7. Expression profiles of *yellow* gene transcripts by RT-PCR. (A) Total RNA was extracted from whole beetles at various developmental stages. PP, 1-2 d-old pharate pupae; P0, 0 d-old pupae; P1, 1 d-old pupae; P2, 2 d-old pupae; P3, 3 d-old pupae; P4, 4 d-old pupae; P5, 5 d-old pupae and A0, 0 d-old adults. *T. castaneum ribosomal protein 6* (*rpS6*) transcript served as an internal control. Red box indicates target genes in this proposed research. (B) Developmental and tissue-specificity of expression of *TcY-g* and *TcY-g2* transcripts. Total RNA was extracted from whole beetles at various developmental stages and from the reproductive systems of 1 month-old adult females or males. *T. castaneum ribosomal protein 6* (*TcrpS6*) transcript with the same cDNA template served as an internal control. E, embryos; YL, young larvae; OL, old larvae; PP, pharate pupae; P, pupae; A0, 0d-old adults, A1, 7-d old adults, Ov, ovary; Te, testis; C, carcass (whole body without reproductive system).

또한, real-time PCR 분석을 통하여 알부터 성충까지의 *Tribolium* 발생과정 동안의 발현양상을 조사하였다. Fig. 8A와 8B에서 보는 바와 같이 *yellow* 유전자의 발현 양상은 매우 다양함을 확인할 수 있었다. *TcY-b*의 경우 prepupa 시기에 주로 발현되는 반면 *TcY-c*와 *TcY-e* transcripts는 알 시기부터 번데기 시기까지 점차 증가하다가 성충시기에 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

*TcY-d*와 *TcY-h* 는 주로 성충시기와 번데기시기에 각각 높게 발현됨을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 *TcY-f*는 주로 먹이를 먹는 시기인 유충과 성충시기에 많이 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한 초파리에는 존재하지 않은 clade X에 속하는 *Tribolium* 5개의 *yellow* 유전자 (*TcY-1* to *TcY-5*)들 역시 매우 다양한 발현 양상을 보여주어 그 기능 역시 다를 것으로 추정할 수 있었다. 이 발현 양상 분석을 본 연구에서 RNAi를 수행하는데 적합한 시기와 조직 등을 추정하는데 활용하였다.

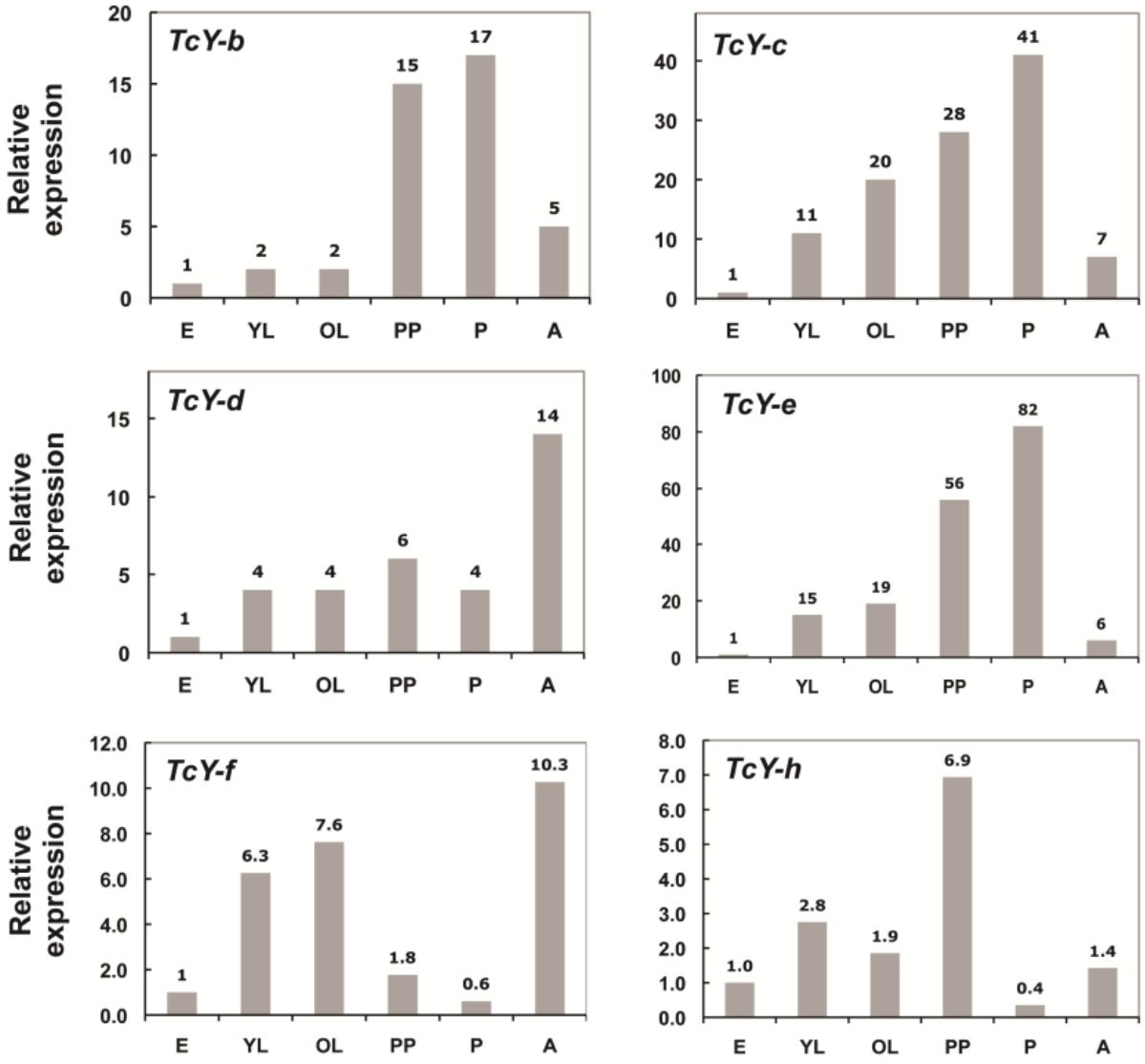


Fig. 8A. Expression profiles of *TcY-b, TcY-c, TcY-d, TcY-e, TcY-f* and *TcY-h* mRNAs during development. Total RNA was extracted from whole beetles (n = 6 to 20 except for embryos) at various developmental stages (embryos to adults). E, embryos; YL, young larvae; OL, old larvae; PP, prepupae; P, pupae; A, mature adults. The transcript levels of the *T. castaneum ribosomal protein 6* (*rpS6*) were used for normalize for differences between samples in the concentration of the template cDNAs. Expression levels for all *yellow* genes are presented relative to the levels of expression in embryos (E).

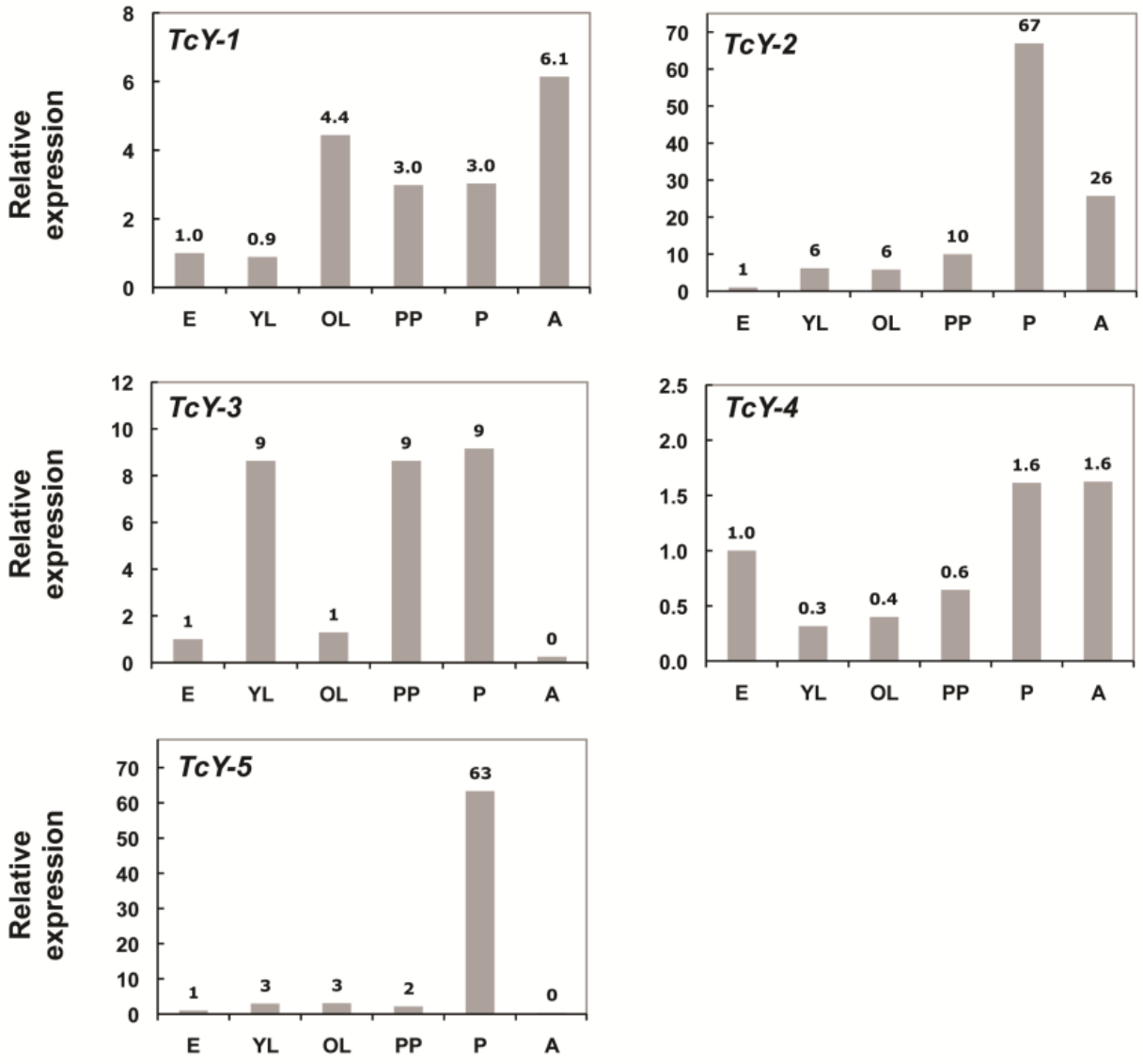


Fig. 8B. Expression profiles of *TcY-1, TcY-2, TcY-3, TcY-4* and *TcY-5* mRNAs during development. Total RNA was extracted from whole beetles (n = 6 to 20 except for embryos) at various developmental stages (embryos to adults). E, embryos; YL, young larvae; OL, old larvae; PP, prepupae; P, pupae; A, mature adults. The transcript levels of the *T. castaneum ribosomal protein 6* (*rpS6*) were used for normalize for differences between samples in the concentration of the template cDNAs. Expression levels for all *yellow* genes are presented relative to the levels of expression in embryos (E).

3.2.3. RNAi 기반 해충방제 후보 유전자 탐색

다음으로 해충방제 후보 *yellow* 유전자를 탐색하기 위하여, 13개 *yellow* 유전자의 transcripts를 감소시키고자 RNAi를 수행하였다. 13개의 *yellow* 유전자의 dsRNA를 합성하여 노숙 유충 시기에 200ng 씩 주사한 후 표현형을 관찰하였다. 그 결과 *TcY-b, -c, -d, -e, -f* 및 *TcY1-5* mixture를 주사한 유충이 다음 유충시기로 탈피하거나 유충이 번데기로 탈피하는 과정에는 아무런 영향을 주지 않았다. 또한 번데기시기에 발생이나 큐티클의 색소침착 역시 정상적임을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 그러나 일부 *yellow* 유전자, 즉 *TcY-d, -e*와 *–f*의 경우 dsRNA를 주사한 번데기가 성충으로 우화하는 과정에서 탈피를 하지 못하고 죽는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 반대로

TcY-b, -c, -h 및 *TcY-1-5* mixture를 주사한 경우 번데기에서 성충으로 탈피하는데 영향을 주지 않고 잘 생존하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, RNAi 수행 후 높은 사충율을 보여주는 유전자는 *TcY-d, TcY-e*와 *TcY-f*였으며, 이들 유전자가 곤충의 발생 및 탈피를 방해하여 해충을 방제에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 보여진다.

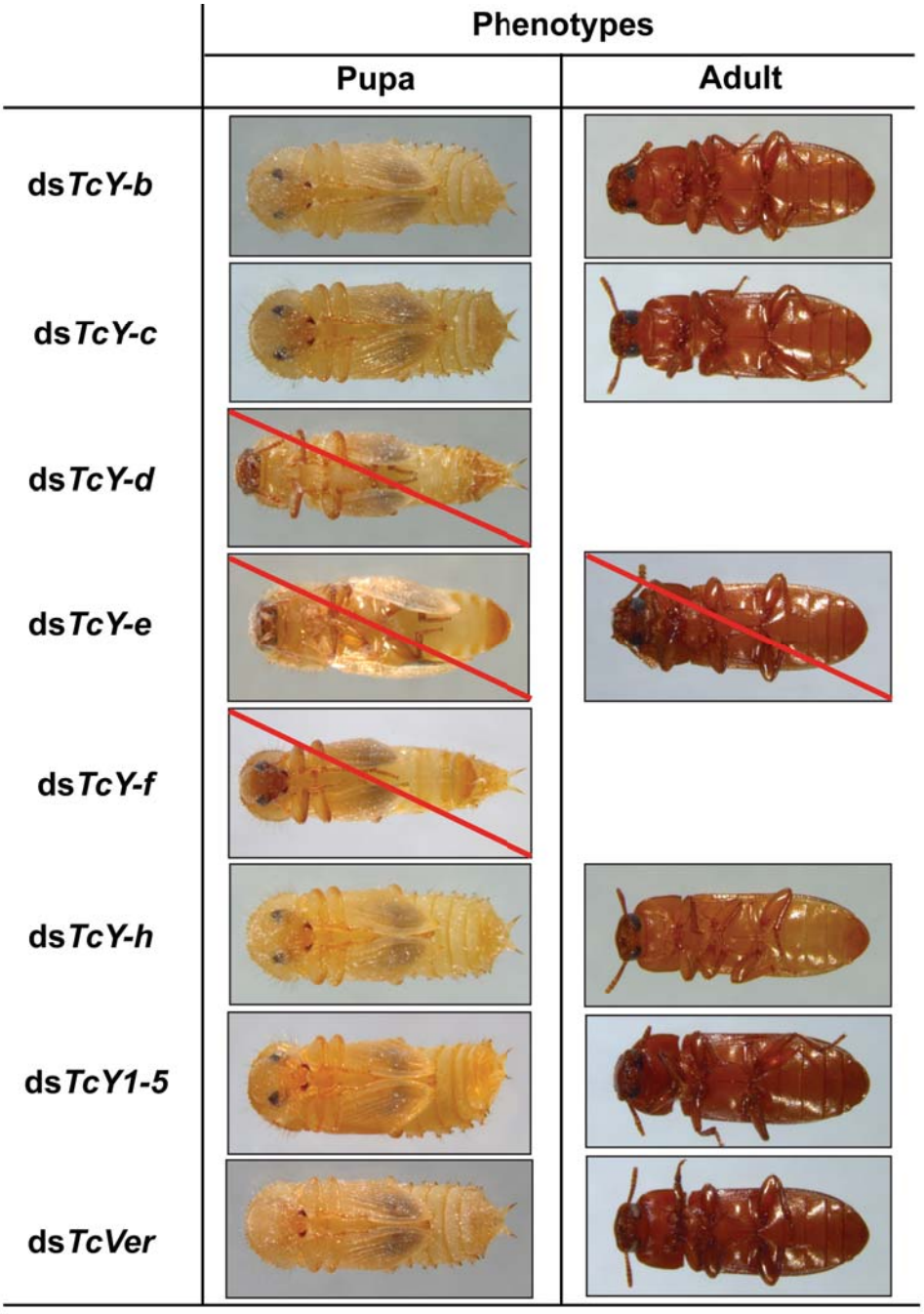


Fig. 9. Phenotypes produced by RNAi for *yellow* genes in *Tribolium*. dsRNAs for each *yellow* genes were injected into late larvae (n = 20). dsRNA for *TcVer* (*vermilion*) was injected to serve as a negative control. Injection of dsRNAs for *yellow* genes studied had no affect on larval-larval and larval-pupal molts, the resulting pupae developed normally and adult cuticle pigmentation proceeded on schedule. However, the pupae treated with ds*TcY-d*, *-e* and *-f* failed adult eclosion and eventually died. ds*TcY-b, -c, -h* and mixture of ds*TcY-1* to *5* had no effect on pupal and adult development and survival. Red slash lines indicate dead animals.

3.2.4. *TcY-f*와 *TcY-d* 유전자의 RNAi에 따른 번데기에서 성충으로의 탈피 실패

*TcY-f, TcY-d*의 dsRNA를 *Tribolium*에 주사한 결과 유충에서 번데기로의 탈피에는 영향을 주지 않고 번데기의 발생도 정상적으로 이루어졌다. 또한 setae, gin traps, urogomphi를 비롯한 번데기의 표피의 tanning도 정상적임을 관찰하였다. 번데기 내의 성충의 머리, 아래턱뼈(mandible), 다리 등의 큐티클 tanning 역시 정상적으로 진행됨을 확인 할 수 있었다. ds*TcY-y*를 처리한 것과는 다르게(**Fig. 4**), pterostigma를 포함한 뒷날개의 black pigmentation 에는 영향을 주지 않았으며, 이는 *Tribolium*에서 *TcY-f, TcY-d*가 번데기와 성충의 큐티클 색소침착에 관여하지 않음을 시사해 준다. 그러나 번데기가 성충으로 탈피하는 과정에서 매우 흥미로운 결과를 관찰 할 수 있었다. 비록 탈피 과정인 apolysis와 slippage 현상이 일어나지만 성충이 번데기의 큐티클를 완전히 벗어내지 못하고 번데기의 큐티클에 싸여 결국에는 죽게 됨을 관찰 할 수 있었다(**Fig. 10**). 이 결과를 통하여, ***TcY-f, TcY-d*가 성충의 큐티클 색소침착보다는 경화작용에 더욱 중요한 역할을 할 것을 시사하여 준다. 따라서 이 두 유전자는 곤충의 탈피를 억제시킴으로써 해충방제 후보 유전자로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.**

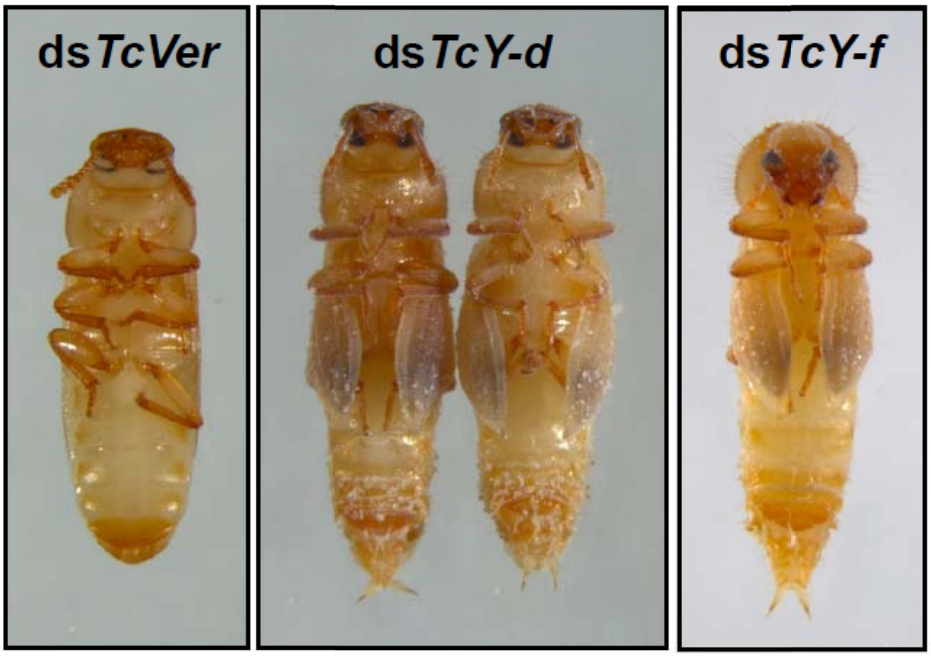


Fig. 10. Effect of dsRNA for *TcY-d* and *TcY-f* on pupal-adult molting. dsRNAs for *TcY-d or TcY-f* was injected into late larvae. dsRNA for *TcVer* (*vermilion*) was injected to serve as a negative control. Injection of ds*TcY-d* and ds*TcY-f* had no effect on larval-pupal molt and pupal development. **However, the resulting pharate adults could not shed their old pupal cuticle and died without undergoing eclosion, suggesting that *TcY-d* and *TcY-f* are a potential target for insect pest control**.

*TcY-d*와 *TcY-f* 유전자의 큐티클 형성과정동안의 정확한 기능을 연구하기 위하여, RNAi 후 큐티클 형태를 TEM 분석을 수행하였다. *TcY-d*와 *TcY-f*의 dsRNA를 유충에 주사한 후 5일째 된 번데기를 80 nm로 thin-section을 수행한 후 TEM을 이용하여 관찰한 결과, 흥미롭게도 RNAi 후 큐티클의 구조, 특히 수평형 키틴층(horizontal chitin laminar)과 수직형 공관(vertical channel structure)에는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 *TcY-d*와 *TcY-f*는 키틴합성이나 큐티클 형성과정에 관여하기 보다는 큐티클을 견고하고 안정화시키는데 관여할 것으로 추정된다.

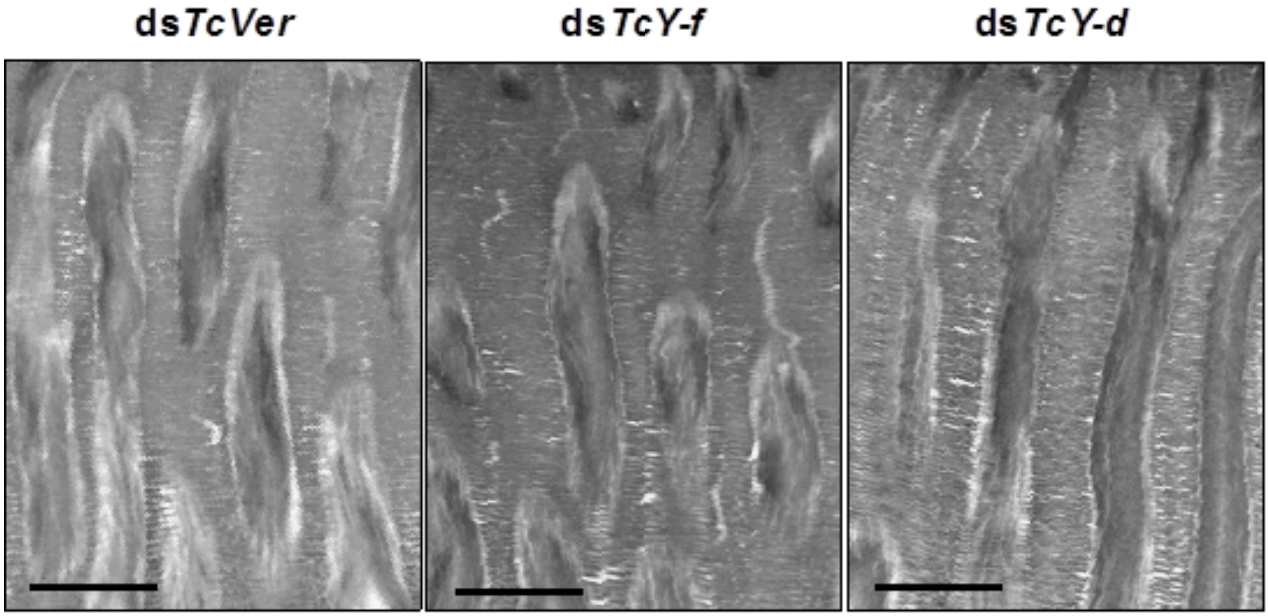


Fig. 11. Ultrastructure of pharate adult rigid body wall cuticle. Transmission electron microscopic analyses show there is no significant morphological difference of cuticle between ds*TcVer*- (*vermilion*, negative control) and ds*TcY-f*- and ds*TcY-d*-treated pharate adults, indicating that TcY-f and TcY-d may not be critical for horizontal chitin laminar organization nor vertical channel structure. Scale bar = 1 ㎛

3.2.5. 난소 특이적 발현 *yellow* 유전자, *TcY-g*와 *TcY-g2*.

초파리의 DmY-g와 DmY-g2는 여포세포의 기능에 매우 중요하고 난황막(vitelline membrane)과 교차 연결되는 기능을 하여 알을 견고하게 하는데 매우 중요한다고 알려져 있다(Claycomb et al., 2004). 초파리 DmY-g mutant 암컷에서 얻은 알은 난황막(vitelline membrane)의 결여에 따른 자연적인 치사가 이루어진다고 보고된 바 있다. 따라서 본 선행연구를 통하여 *Tribolium*에서 초파리의 *DmY-g*와 *DmY-g2*의 orthorog를 확보하고(**Figs. 12A**), *TcY-g*와 *TcY-g2* 유전자의 발생과정 및 조직특이적 발현 양상을 확인하였다. 이 두 유전자는 8th linkage group에서 시작 코돈이 259개의 뉴클레오타이드 간격으로 head-to-head 방향으로 매우 밀접하게 연결되어 있다. 이들 각 Yellow 단백질은 1개에서 4개의 *N*-glycosylation 예상 sites를 가지고 있으나 TcY-g와 TcY-g2의 경우에는 *N*-glycosylation site가 없는 것으로 보여진다(**data not shown**).

RT-PCR 결과 발생과정 전반에 거쳐 *TcY-g*와 *TcY-g2*의 발현양이 극히 적으나(**Fig. 12B, top panels**), 성숙한 성충의 경우에는 *TcY-g*와 *TcY-g2* 발현이 과발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 예상한 바와 같이 이 두 유전자는 주로 암컷 성충의 난소에서 발현하는 것을 확인 하였으며 (**Fig. 12B, bottom panels**), 이를 통하여 **TcY-g와 TcY-g2가 초파리의 DmY-g와 DmY-g2와 같이 알을 견고화하기 위하여 난황막(vitelline membrane)과 교차 결합을 하는 유사한 역할을 할 것으로 추정하고 RNAi를 수행하였다.**

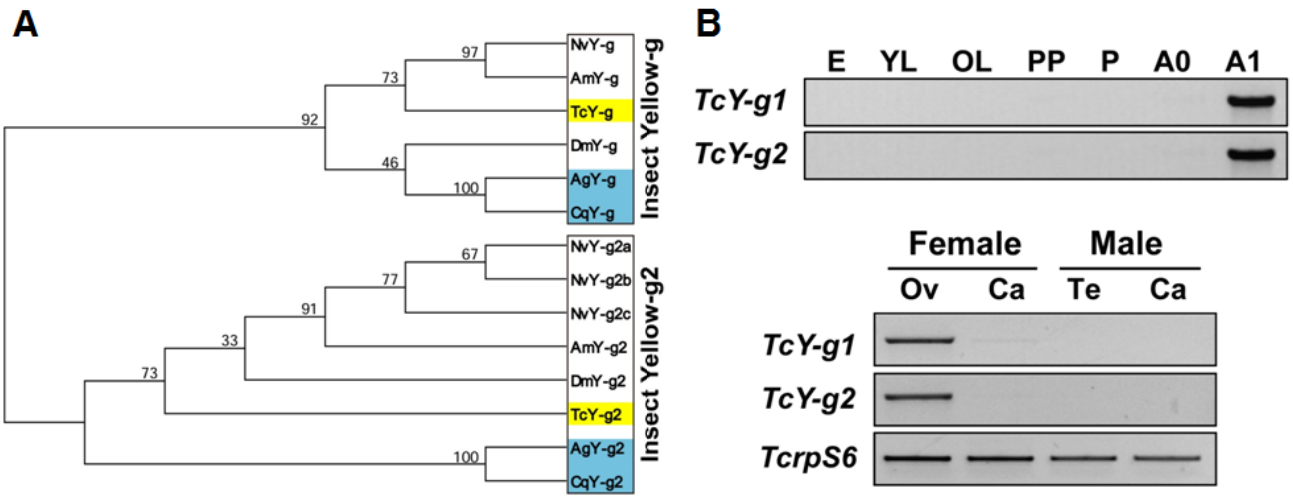


Fig. 12. (A) Phylogenetic analysis of insects Yellow-g and Yellow-g2. ClustalW software was used to perform multiple sequence alignments prior to phylogenetic analysis. The phylogenetic tree was constructed by MEGA4 software using Neighbor-joining (Tamura et al., 2004). Yellow highlights indicate *Tribolium* Yellow-g (TcY-g) and Yellow-g2 (TcY-g2). **(B) Developmental and tissue-specificity of expression of *TcY-g* and *TcY-g2* transcripts.** Total RNA was extracted from whole beetles at various developmental stages and from the reproductive systems of 1 month-old adult females or males. *T. castaneum ribosomal protein 6* (*TcrpS6*) transcript with the same cDNA template served as an internal control. E, embryos; YL, young larvae; OL, old larvae; PP, pharate pupae; P, pupae; A0, 0d-old adults, A1, 7-d old adults, Ov, ovary; Te, testis; C, carcass (whole body without reproductive system).

*TcY-g*와 *TcY-g2*가 난각의 견고화에 중요한 역할을 하는지 알아보기 위하여, 이 두 유전자의 dsRNA를 성숙한 성충 암컷에 주사하였다(parental RNAi). **흥미롭게도 ds*TcY-g*와 ds*TcY-g2*를 주사한 암컷은 산란하지 않는 것을 확인 할 수 있었으며**, 이는 dsRNA 처리가 난소 형성이나 발생에 영향을 줄 것으로 추정하고 성충 암컷에서 난소를 해부하여 관찰하였다. 그 결과 dsRNA를 주사해 준 성충 암컷의 난소에서는 알들이 측수란관(lateral oviduct)와 총수란관(common oviduct)에서 collapse되어 있음을 확인 할 수 있었다. 이는 아마도 *TcY-g*와 *TcY-g2*가 감소된 경우 난각이 정상적으로 형성되지 못하여 쉽게 으스러지는 것으로 추정된다(**Fig. 13**). 따라서 ***TcY-g*와 *TcY-g2* 유전자를 RNAi한 결과 성충 암컷이 산란을 하지 못하는 것으로 보아 이를 해충방제에 이용하여 성충의 산란을 억제 시킨다면 좋은 해충방제 후보 유전자가 될 것으로 사료된다.**

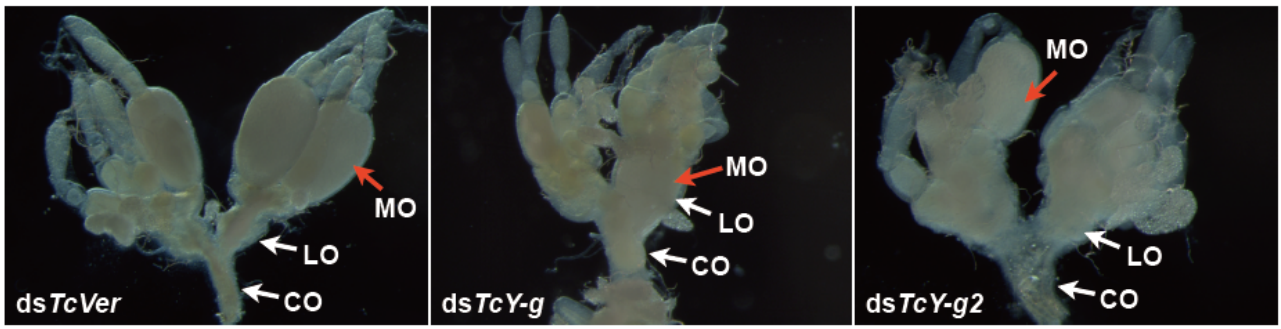


Fig. 13. Collapse eggs in the ovaries of ds*TcY-g*- and ds*TcY-g2*-treated adult females. dsRNA for *TcY-g* and *TcY-g2* were injected into virgin adult females (n = 20) and then mated with equal number of non-dsRNA treated-males. ds*TcVer* (vermilion) was injected to serve as a negative control. None of females treated with dsRNA for *TcY-g* or *TcY-g2* oviposited. Eggs from the females treated with dsRNAs for either gene appears to collapse in their lateral and/or common oviduct resulting in abnormal shapes of ovaries. CO, common oviduct; LO, lateral oviduct; MO (red arrow), mature oocyte.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

4.1. Achievement and contribution rate in this research field (목표달성도 및 관련분야에의 기여도)

연구내용 및 연구범위 (contents and Range)	Achievement rate 달성도(%)	평가착안점 (Point of evaluation)	Contribution rate 기여도(%)
발생과정동안 *yellow* 유전자들의 발현 양상 조사	100	- *Tribolium yellow* 유전자의 발생과정 및 조직 특이적 발현 양상 분석 여부 - RNAi 후 표현형 및 형태적 변화 분석 - 해충방제를 위한 잠재적 후보 *yellow* 유전자 확보 및 제시	90%
RNAi 기반 해충 방제 후보 물질 탐색	100		

곤충에서 *yellow* 유전자 family는 매우 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 보여진다. 그러나 *yellow-y*를 제외한 대부분의 *yellow* 유전자의 기능은 밝혀져 있지 않다. 초파리와 누에의 *yellow-y*는 큐티클의 색소침착에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 *Tribolium*의 *yellow* 유전자들 중 일부가 곤충의 색소침착 보다는 발생이나 생존에 더욱 중요한 역할을 할 것으로 추정하고, 이를 밝히기 위하여 *yellow* 유전자의 기능 유전체학적 연구에 초점을 맞추어 연구를 수행하였다. 이를 위하여 *Tribolium*의 발생과정동안의 13개의 *yellow* 유전자의 발현양상을 real-time PCR을 통하여 분석한 결과, 각 *yellow* 유전자들의 발현 양상이 매우 다양함을 확인할 수 있었으며, 이는 유전자들이 각기 다른 기능을 할 것 또한 시사한다. 우리는 각 *yellow* 유전자를 RNAi를 통하여 어떠한 *yellow* 유전자가 해충을 방제하기 위한 좋은 후보 유전자인지를 조사하였다. 그 결과 일부 유전자들을 RNAi 하였을 때 탈피에 실패하거나 탈수 현상이 일어나는 등 치사되는 것을 관찰할 수 있었다. 본 연구를 통하여, ***yellow* 유전자들이 색소침착 뿐 만 아니라 곤충의 생장, 발생, 생존, 난각 형성 과정 등에 중요한 역할을 할 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 곤충의 *yellow* gene family의 새로운 기능을 보고할 뿐만 아니라 곤충의 큐티클과 난각 형성을 타깃한 선택적이고 환경 친화적인 해충 방제에 기초 지식과 전략을 제공하는데 기여할 수 있을 것이다.**

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

5.1. Research achievements (연구개발 성과)

우선 본 연구를 수행할 수 있도록 지원해준 IPET에 감사한다. 지난 한 해 동안, 곤충의 *yellow* family의 기능을 좀 더 깊이 있게 이해하고자 본 연구를 수행하였으며, 그중 일부 *yellow* 유전자가 곤충의 생장 및 발생에 영향을 주어 해충방제에 활용될 수 있을지에 대하여 알아보았다. 예를 들면, RNAi 실험 기법을 이용하여 어떠한 *yellow* 유전자들이 해충방제에 중요한 타깃이 될 수 있을지 조사한 결과, *TcY-d*, *TcY-e*, *TcY-f*, *TcY-g* 및 *TcY-g2*가 dsRNA에 의한 유전자 발현의 감소로 높은 사충율을 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *TcY-d*, *TcY-e*, *TcY-f*, *TcY-g* 및 *TcY-g2*가 곤충의 큐티클 색소침착보다 곤충의 발생, 생장 및 생존에 더욱 중요한 역할을 하는 것을 시사해줄 뿐만 아니라, *yellow* 유전자들의 기능이 색소침착 이외에 새로운 기능이 있다는 것을 처음으로 밝혀, 곤충의 *yellow*의 기능을 더욱 깊이 있게 이해할 수 있어 그 학문적 의의도 매우 크다. 이러한 흥미로운 결과를 국제 학술지에 투고하기위하여 현재 논문을 작성 중에 있다.

5.2.1. Poster presentation in the Entomological Society of Korea (국내 학회 포스터 발표)

- 학술대회명: 한국곤충학회 춘계학술대회
- 주최: 한국곤충학회
- 장소: 전북대학교 농업생명과학대학 본관
- 일시: 2012년 4월 20일 – 21일
- 포스터 발표 제목: *Yellow-g* and *-g2* are reqired for eggshell formation in *Aedes albopictus* (Diptera) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera).

5.2. Expected advances（기대성과）

5.2.1. Broader impacts for education (학문적, 인력양성 측면)

본 연구를 통하여 국내의 대학원생들이나 박사 후 연수 과정 학생들이 곤충의 큐티클 색소침착 및 경화 과정에 관여하는 유전자들의 기능 연구를 수행하게 될 것 이다. 따라서 본 연구의 주된 연구 내용인 곤충 생리학과 곤충 큐티클의 형성과정에 대한 이해 뿐 만 아니라 생화학 및 분자 생물학의 기초 지식부터 수준 높은 실험 기법까지 습득하게 되어 독립된 과학자로서 성장하는데 강점을 가지게 될 것이다. **특히 국내에는 곤충의 큐티클 형성과정 및 키틴 대사과정에 대한 연구하는 학자들이 거의 없어, 본 연구 수행을 통하여 국내 곤충 큐티클 및 외골격 연구 분야의 전문가 및 우수 인력을 양성 할 수 있을 것이다. 특히, 본 연구 책임자는 국외 여러 우수학자들과 교류를 하고 있어 국내 박사과정, 석사과정 및 박사후연수 과정의 학생들이 해외 석학들과 접하는 기회가 많아 국내 학생의 수준을 국제화시키는데 시너지 효과를 낼 수 있을 것으로 사료된다.**

5.2.2. Broader impacts for application（기술적, 경제·산업적 측면）

본 연구 결과는 생물학, 생화학, 분자생물학 등 기초 학문뿐 만 아니라 해충 방제에 대하여도 큰 영향을 줄 것이다. 세포외 기질(Extracellular matrices, ECM)은 곤충의 경우 키틴과 단백질을 함유하고 있으며, 식물은 셀룰로스, 동물의 경우 hyalurona로 이루어져 있으며, 세포, tubule, 조직의 형태를 유지하고 조절하는 것을 도와준다. tube 형태 발생과 같은 발생학적 과정은 다낭성신종(polycystic kidney disease)과 동맥경화증 (atherosclerosis)과 같은 인간의 유전적 결함에도 응용할 수 있을 것이다.

***T. castaneum*을 이용하여 본 연구를 수행 후 얻은 지식은 인간을 포함한 모든 동물의 기관 형태 발생과 tubule 발생에 광범위한 영향을 줄 수 있을 것이다 더욱이 절지동물 또는 곤충의 발생과 생존에 필수적인 novel insect growth regulators(IGR)를 이용하여 해충의 성장이나 발생을 억제시킴으로써 해충을 방제하는 신개념 친환경 해충방제제와 인체에 무해한 선택적인 해충을 방제제 개발을 위한 새로운 후보 물질을 확보 할 수 있을 것이다.** (**see section 5.2**).

더나아가 곤충의 중요한 생리적 시스템을 보다 잘 이해하는 것은 곤충 큐티클을 생물소재로서 이용 할 수 있을 것이며 곤충 큐티클의 생화학을 기초로 한 새로운 형태의 합성 바이오 폴리머를 생산하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 이는 단순히 곤충의 경화과정을 이해하는 목적을 넘어 “생체모방”의 새로운 분야로서 의약, 농업, 항공우주산업에 적용할 수 있는 잠재적 응용기술이 될 것이다 **(Fig. 14).**

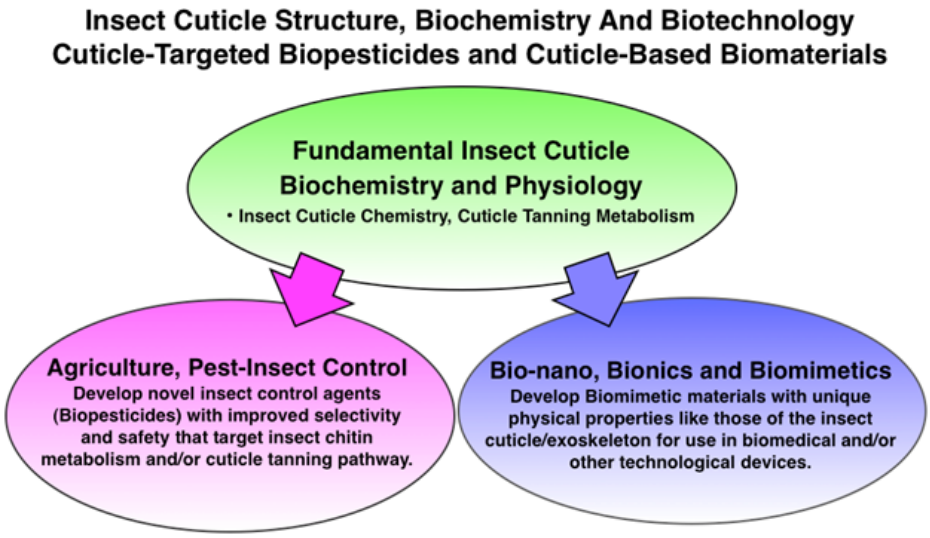


Fig. 14. Application of the information gained from this research proposal. The knowledge gained from this research proposal will provide fundamental understanding of mechanisms of insect cuticle formation and maturation, and could open up new two strategies. One is for selective pest insect control and develop novel bio-insecticides, which target cuticle biochemistry with minimizing detrimental effects on the environment and non-target insects, and the other is for developing novel biomimetic materials/devices, which possess unique physical properties like those of insect cuticle.

5.3. Apply to pest insect control (연구개발결과 해충방제에 응용)

Pigmentation/melanization 과정은 곤충에 있어 매우 중요한 생리적 과정으로 큐티클의 착색화와 경화, 상처 치유, 캡슐화를 비롯한 방어 반응, 난각의 견고화하는데 관여한다. Yellow는 멜라닌 합성 과정에서 중요한 역할을 한다. 비록 dopachrome을 DHI로 전환하는데 비효소적 반응에 의해 진행하지만 이는 곤충에서 적당한 양과 신속한 멜라닌화 반응을 시키는데 너무 느리다. 따라서 신속한 pigmentation과 melanization 반응을 위해서 곤충이 특이적인 Yellow 단백질들을 가지게 되었는지를 설명할 수 있을 것이다. 그러나 초파리의 *yellow-y*를 제외하고 각각의 *yellow* 유전자들의 생물학적, 생리학적인 기능에 대하여는 거의 알지 못한다.

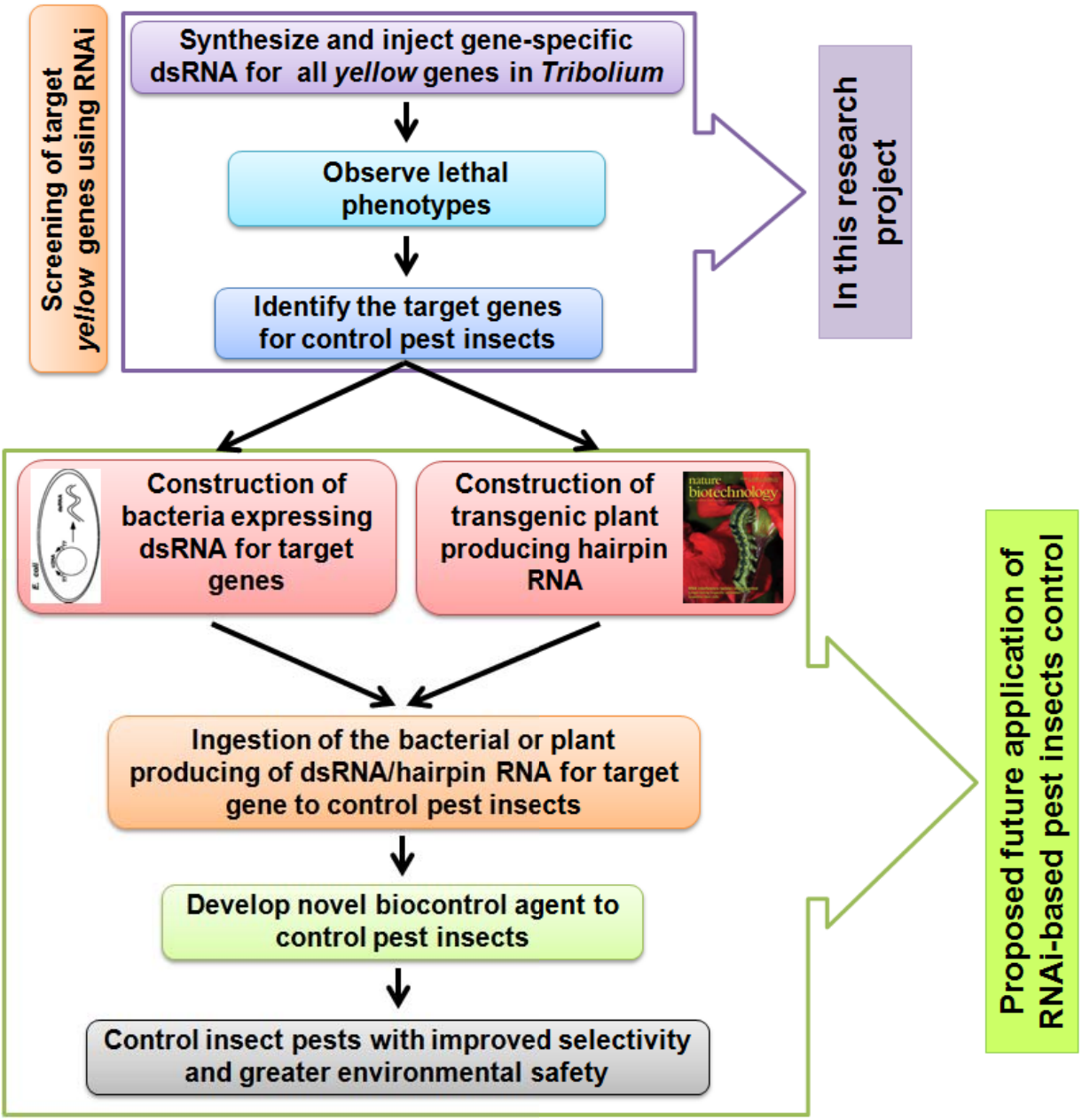
따라서 본 연구를 통하여 얻은 결과는 곤충의 큐티클 및 난각의 착색화, 경화, 안정화에 대한 더 많은 지식을 얻게 될 것이고, 더 나아가 농해충과 질병매개곤충을 선택적이고 환경 친화적인 개선된 방제에 사용할 수 있는 새로운 타켓 후보 물질을 얻는데 이용할 수 있을 것이다.

최근 RNAi를 기반으로 한 해충방제에 대하여 많은 관심을 가지고 연구되고 있으며 그 결과가 최근 국제적인 저널에 보고되고 있다. 예를 들면 Mao et al. (2008)와 Baum et al. (2008)가 *Helicoverpa armigera* (Lepidopteran) P450 monooxygenase와 *Diabrotica virgifera* (Coleopteran)의 V-ATPase의 hairpin-RNA (dsRNA)를 발현시키는 형질전환 식물을 이용하여 RNAi를 기반으로 하는 해충방제에 대하여 보고한 바 있다. 본 논문에서는 hairpin-RNA가 발현되는 형질 전환 식물을 섭취한 곤충의 사충율이 매우 높은 것을 보고하였는데 이는 먹이를 먹은 곤충 체내에서 hairpin-RNA가 발현되어 RNAi가 작동되어 곤충이 가진 P450 monooxygenase 또는 V-ATPase의 유전자 발현이 줄어들면서 생긴 현상이다. 이 두 논문에서 보고된 바와 같이 RNAi 기법이 단순이 유전자 기능을 연구하는데 사용되는 것 뿐 만 아니라 해충을 방제하는데도 매우 유용

한 기법이 될 수 있음을 시사해 주었다.

따라서 본 연구를 통하여 얻은 결과는 곤충의 큐티클 형성과정을 좀 더 깊이 있게 이해할 수 있을 뿐만 아니라 농해충과 위생해충들을 방제하기위한 선택적이고 환경 친화적인 해충 방제 후보 유전자를 탐색하고 발굴하는데 기여할 것으로 사료된다.

Strategy of proposed RNAi-based pest insect control



Applied Biotechnology: RNAi Based-Pest Insect Control

A

ARTICLES

nature biotechnology

Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol

Ying-Bo Mao[1,2], Wen-Juan Cai[1,2], Jia-Wei Wang[1,2], Gao-Jie Hong[1,2], Xiao-Yuan Tao[1,2], Ling-Jian Wang[1], Yong-Ping Huang[1] & Xiao-Ya Chen[1]

We identify a cytochrome P450 gene (*CYP6AE14*) from cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*), which permits this herbivore to tolerate otherwise inhibitory concentrations of the cotton metabolite, gossypol. *CYP6AE14* is highly expressed in the midgut and its expression correlates with larval growth when gossypol is included in the diet. When larvae are fed plant material expressing double-stranded RNA (dsRNA) specific to *CYP6AE14*, levels of this transcript in the midgut decrease and larval growth is retarded. Both effects are more dramatic in the presence of gossypol. As a glutathione-*S*-transferase gene (*GST1*) is silenced in *GST1* dsRNA–expressing plants, feeding insects plant material expressing dsRNA may be a general strategy to trigger RNA interference and could find applications in entomological research and field control of insect pests.

http://www.nature.com/naturebiotechnology Group

B

nature biotechnology

Control of coleopteran insect pests through RNA interference

James A Baum[1], Thierry Bogaert[2], William Clinton[1], Gregory R Heck[1], Pascale Feldmann[2], Oliver Ilagan[1], Scott Johnson[1], Geert Plaetinck[2], Tichafa Munyikwa[1], Michael Pleau[1], Ty Vaughn[1] & James Roberts[1,3]

Commercial biotechnology solutions for controlling lepidopteran and coleopteran insect pests on crops depend on the expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins[1,2], most of which permeabilize the membranes of gut epithelial cells of susceptible insects[3]. However, insect control strategies involving a different mode of action would be valuable for managing the emergence of insect resistance. Toward this end, we demonstrate that ingestion of double-stranded (ds)RNAs supplied in an artificial diet triggers RNA interference in several coleopteran species, most notably the western corn rootworm (WCR) *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. This may result in larval stunting and mortality. Transgenic corn plants engineered to express WCR dsRNAs show a significant reduction in WCR feeding damage in a growth chamber assay, suggesting that the RNAi pathway can be exploited to control insect pests via *in planta* expression of a dsRNA.

initial bioassays, dsRNAs were applied to the surface of the WCR agar diet at concentrations from 520 ng/cm^2 to 780 ng/cm^2. As we anticipated a slower response to dsRNAs than to *B. thuringiensis* insecticidal proteins, the WCR bioassay incubation period was extended from 5 d to 12 d. Indeed, 7 d after infestation, little if any effect was observed. However, numerous dsRNAs exhibited significant activity 12 d after infestation, resulting in both larval stunting and mortality (**Supplementary Table 1** online).

Subsequent feeding assays demonstrated that certain dsRNA samples, including dsRNAs targeting putative genes encoding vacuolar ATPase (V-ATPase) subunit A, D and E, as well as α-tubulin, were active at applied concentrations well below 52 ng/cm^2. We identified additional WCR genes that caused mortality when targeted for suppression using dsRNAs in the WCR feeding assay. A two-tiered screen was implemented in which dsRNAs targeting different genes were tested at 52 and 5.2 ng/cm^2. Of the 290 dsRNAs tested, 125 showed significant ($P < 0.05$) larval mortality and/or stunting at

Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturebiotechnology

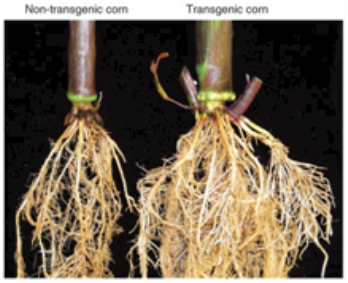


Table 2. Insect terminology

영 문	국 문
cuticle	표피 (큐티클)
exoskeleton	외골격
epidermis	표피세포
pigmentation	색소침착
melanization	멜라닌화
sclerotization	경화
chitin	키틴
envelop	외막층
epicuticle	외표피층
procuticle	원표피층
exocuticle	외원표피층
endocuticle	내원표피층
elytra	겉날개
hindwing	뒷날개
pterostigma	연문
setae	강모
urogomphi	꼬리 돌기
mandible	아래턱뼈
apolysis	아폴리시스
ovary	난소
eggshell	난각
vitelline membrane	난황막

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

(해당없음)

제 7 장 연구시설·장비 현황

(해당없음)

제 8 장 참고문헌 (References)

1. Amenya, D. A., Chou, W., Li, J., Yan, G., Gershon, G., James, A. A., Marinotti, O. (2010) Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. J. Insect Physiol. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.04.013.
2. Albert, S., Klaudiny, J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. J. Insect Physiol. 50.
3. Andersen, S. O. (2005) Cuticular sclerotization and tanning. In Comprehensive Molecular Insect Science (Gilbert, L. I., Iatrou, K., Gill, S.J., ed) Vol. 4, pp. 145-170, Elsevier, New York
4. Andersen, S.O. (2010) Insect cuticlar sclerotization: a review. Insect Biochem. Mol. Biol. 40.
5. Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Kanost, M. R., Kramer, K. J. (2005a) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11337-11342.
6. Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., Kanost, M. K., Beeman R. W. (2005b) The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. Insect Molec. Biol. 14, 453-463.
7. Arakane, Y., Li, B., Muthukrishnan, S., Beeman R. W., Kramer, K. J., Park, Y. (2008) Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, Tribolium castaneum. Mechan. Develp. 125, 984-995.
8. Arakane, Y., Specht, C.A., Beeman, R.W., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. (2008) Chitin synthases are required for survival, fecundity, egg-hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Molec. Biol. 38, 961-964.
9. Arakane, Y., Lomakin, J., Beeman, R.W., Muthukrishnan, S., Gehrke, S.H., Kanost, M. R., Kramer, K.J. (2009) Molecular and functional analyses of amino acid decarboxylases involved in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. J. Biol. Chem. 284.
10. Arakane, Y., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R. (2010) Identification, mRNA expression and functional analysis of several yellow family genes in *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Molec. Biol. 40, 259-266.
11. Arakane, Y., Muthukrishnan, S. (2010) Insect chitinases and chitinase-like proteins. Cell. Molec. Life Sci 67, 201-216.
12. Arakane, Y., Baguinon, M.C., Jasrapuria, S., Chaudhari, S., Doyungan, A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W. (2011) Both UDP *N*-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are criticl for molting, survival and fecundity. Insect Biochem. Molec. Biol. 41, 42-50.
13. Arakane, Y., Taira, T., Ohnuma, T., Fukamizo, T. (in press) Chitin-related enzymes in agro-biosciences. Curr. Drug Targets.
14. Drapeau, M.D. (2001) The family of yellow-related *Drosophila melanogaster* proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 611-613.
15. Drapeau, M.D., Albert, S., Kucharski, R., Prusko, C., Maleszka, R. (2006b) Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. Genome Res. 16.
16. Eichler, C., Lomakin, J., Arakane, Y., Kramer, K.J., Kanost, M.R., Gehrke, S.H. (2005) Insect cuticle as a motif for biomimetic materials. In Advances in Biomedical Applications of Nanotechnology (Bionanotechnology), N.A., Peppas, J. Z. Hilt eds., AIChE, New York, NY, p. 44-48.
17. Eichler, C., Lomakin, J., Arakane, Y., Kramer, K.J., Kanost, M.R., Gehrke, S.H. (2006) Insect cuticle as a motif for biomimetic materials. In Proceedings AIChE Annual Meeting, American Institute of Chemical Engineers, New York, NY, p. 4309-4313.

18. Futahashi, R., Fujiwara, H. (2007) Regulation of 20-hydroxyecdysone on the larval pigmentation and the expression of melanin synthesis enzymes and yellow gene of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 37.
19. Futahashi, R., Sato, J., Meng, Y., Okamoto, S., Daimon, T., Yamamoto, K., Suetsugu, Y., Narukawa, J., Takahashi, H., Banno, Y., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K., Fujiwara, H. (2008) yellow and ebony are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. Genetics 180, 1995.
20. Gompel, N., Prud'homme, B., Wittkopp, P.J., Kassner, V.A., Carroll, S.B. (2005) Chance caught on the wing: cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. Nature 433.
21. Gorman, M.J., Arakane, Y. (2010) Tyrosine hydroxylase is required for sclerotization and pigmentation of newly synthesized cuticle in *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol., 40, 267-273.
22. Han, Q., Fang, J., Ding, H., Johnson, J.K., Christensen, B. M., Li, J. (2002) Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as depachrom-conversion enzymes. Biochem J. 368, 333-340.
23. Hopkins, T. L., Kramer, K.J. (1992) Insect cuticle sclerotization. Annual Rev. Entomol. 37, 273-302.
24. Ito, K., Katsuma, S., Yamamoto, K., Kadono-Okuda, K., Mita, K., Simada, T. (2010) Yellow-e Determines the color pattern of larval head and tail spots of the silkworm *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 285, 5624-5629.
25. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24.
26. Li, J. (1994) Egg chorion tanning in Aedes aegypti mosquito. Comp Biochem Physiol. 109, 835-43.
27. Lomakin, J., Arakane, Y., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Kanost, M. R., Gehrke,S.H. (2010) Mechanical properties of elytra from Tribolium castaneum wild-type and body color mutant strains. J Insect physiol. 56, 1901-1906.
28. Lomakin, J., Patricia, H.A., Eichler, C., Arakane, Y., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Kanost, M. R., Gehrke,S.H. (2011) Mechanical properties of beetle elytral cuticle, a hierarchically ordered biomaterial. Biomacromolecules. 12, 321-335.
29. Lorenzen, M.D., Brown, S.J., Denell, R.E., Beeman, R.W. (2002a) Transgene expression from the *Tribolium castaneum* Polyubiquitin promoter. Insect Molec. Biol. 11, 399-407.
30. Lorenzen, M., Brown, S. J., Denell, R. E., Beeman, R. W. (2002b) Cloning and characterization of the *Tribolium castaneum* eye-color genes encoding tryptophan oxygenase and kynurenine 3-monooxygenase. Genetics 160, 225-234.
31. Moussian, B., Seifarth, C., Berger, J., Schwarz, H. (2006) Cuticle differentiation during *Drosophila* embryogenesis. Arthropod struct Dev. 35, 137-52.
32. Ostrowski, S., Dierick, H. A., Bejsovec, A. (2002) Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Genetics 161, 171-182.
33. Prud'homme, B., Gompel, N., Carroll, S.B. (2007) Emerging principles of regulatory evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 8605-8612.
34. Richards S, *et al.* (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452: 949-955.
35. Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., Simuth, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. Cell Mol. Life Sci. 54.
36. Simon, J.D., Peles, D., Wakamatsu, K., Ito, S., 2009. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. Pigment Cell Melanoma Res. 22, 563-579.

37. Sugumaran, M. (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. Pigment Cell Res. 15, 2-9.
38. Tomoyasu, Y., Denell, R.E. (2004) Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. Dev Genes Evol. 214, 575–578.
39. Tomoyasu, Y., Arakane, Y., Kramer, K.J., Denell, R.E. (2009) Repeated co-options of exoskeleton formation during wing-to-eytron evolution in beetles. Curr. Biol.19.
40. Tonning, A., Helms, S., Schwarz, H., Uv, A.E., Moussian, B. (2006) Hormonal regulation of mummy is needed for apical extracellular matrix formation and epithelial morphogenesis in *Drosophila*. Development 133.
41. Wittopp, P.J., True, J.R., Carroll, S.B. (2002a) Resiprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigmentation patterns. Development 129, 1849-1858.
42. Wittkopp, P.J., Vaccaro, K., Carroll, S.B. (2002b) Evolution of yellow gene regulation and pigmentation in *Drosophila*. Curr. Biol. 12.
43. Wittopp, P.J., Carroll, S.J., Kopp, A. (2003) Evolution in black and white: genetic control of pigment pattern in *Drosophila*. Trend Genet. 19, 495-504.
44. Wittkopp, P.J., Beldade, P. (2009a) Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. Semin. Cell Dev. Biol. 20.
45. Wittkopp, P.J., Stewart, E.E., Arnold, L.L., Neidert, A.H., Haerum, B.K., Thompson, E.M., Akhras, S., Smith-Winberry, G., Shefner, L. (2009b) Intraspecific polymorphism to interspecific divergence: genetics of pigmentation in *Drosophila*. Science 326, 540-544.
46. Wittkopp, P.J., Beldade, P. (2009c) Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. Semin. Cell Dev. Biol. 20.
47. Zhu, Q., Arakane, Y., Beeman, R.W., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. (2008) Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 6650.
48. Xia, A.H., Zhou, Q.X., Yu, L.L., Li, W.G., Yi, Y.Z., Zhang, Y.Z., Zhang, Z.F. (2006) Identification and analysis of YELLOW protein family genes in the silkworm, *Bombyx mori*. BMC Genomics 7, 195.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업(*신진연구자지원*)의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업(*신진연구자지원*)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.