



과제구분	기관고유	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제명		연구분야	수행기간	연구실	책임자
천적 및 유용곤충 이용기술 개발		작물보호	'17~'24	농업기술원 환경농업연구과	윤승환
페로몬 생합성기작 구명 및 생리응용 방제기술 개발		작물보호	'22~'24	농업기술원 환경농업연구과	윤승환
색인용어	페로몬, 곤충생리, 총채벌레, 신경호르몬, 수용체				

ABSTRACT

This study was conducted to develop a novel pest control technology utilizing insect physiology by characterizing the pheromone and neuropeptides in the *Frankliniella occidentalis*. Cell-based assays evaluating the activity of *F. occidentalis* Pyrokinin and CAPA peptides on the Pyrokinin and CAPA receptors of *Halyomorpha halys* revealed that the Pyrokinin peptide activated the Pyrokinin receptor (PK-R), while the CAPA peptide activated the CAPA receptor (CAPA-R). Transcriptome analysis of *F. occidentalis* antennae identified a total of 1,949 differentially expressed gene sequences between males and females. Analysis of the *F. occidentalis* pheromones using SPME revealed that pheromones were detected only in males, and the composition ratios of the pheromone compounds differed between the Korean and U.S. populations. Some individual pheromone compounds exhibited either attractive or repellent effects depending on their concentration. After formulating five combinations of the pheromone components of the western flower thrips into lures, attraction tests showed that all combinations, except for the control, exhibited attractant effects. To evaluate the synthetic peptides *in vivo*, a Nano-jection method using a nanoinjector and vacuum stage, as well as Feeding assay method, were established. Two synthetic peptides exhibited agonistic and antagonistic effects at the cellular level, but no significant effects were observed when administered *in vivo*. These results suggest that further design and selection of synthetic peptides, along with additional evaluations at both the cellular and organismal levels, are necessary.

Keywords: pheromone, insect physiology, *Frankliniella occidentalis*, pest control, neuropeptide, receptor

1. 연구목표

총채벌레는 세계적으로 분포하며 광식성 해충으로 다양한 작물에서 큰 피해를 주며 잎, 꽃, 눈, 잎집 등 식물의 전 부위에 서식하고 온실, 정원 및 노지 등 다양한 환경에서 발생한다. 대부분의 총채벌레는 흡즙 및 바이러스 매개를 통해 작물에 큰 피해를 주며 해충 종합적방제 체계를 파괴시킬 수 있는 강력한 해충이다(Morse & Hoddle, 2006; Demirozer et al., 2012; Mouden et al., 2017). 특히 꽃노랑총채벌레는 전 세계적으로 농작물에 심각한 피해를 주는 중요한 해충으로 산란, 섭식에 의한 피해 뿐만 아니라 토마토위조반점바이러스(TSWV)를 매개하여 경제적으로도 중요한 해충이다. 최근 꽃노랑총채벌레의 게놈 분석을 통한 화학 및 시각신호 수용, 기주식물의 탐색, 면역생리 등 곤충의 생리적 기능의 접근을 통해 방제효율을 높이고자 하는 연구가 수행되고 있다(Rotenberg et al., 2020).

페로몬은 동종의 다른 개체로 특정한 고정행동을 유발하는 냄새 통신물질로 곤충생존에 중요한 역할을 수행하며(Karlson and Lüscher, 1959; Murmu et al., 2020; Park, 2022) 동종의 동물끼리 의사소통에 사용되는 화학적신호로써, 체외 분비성 물질이며 성페로몬, 집합페로몬, 경보페로몬, 계급분화페로몬 등 행동과 생리를 조절하는 여러종류가 존재 한다(Yang, 2022). 페로몬은 종특이성이 강하고, 적은 양으로 효과적인 활성을 나타내며 다른 생물에 독성이 없는 특징으로 친환경 해충방제제로 널리 사용되고 있으며 국내에선 과수의 나방류와 노린재류 해충 발생예찰과 방제수단으로 널리 활용되고 있다(Yang, 2022). 페로몬은 곤충의 체내에서 합성이 이루어 지며 페로몬 합성은 곤충신경호르몬에 의하여 조절된다.

곤충신경호르몬(신경펩타이드;Neuropeptide)은 곤충의 신경세포에서 분비되는 곤충호르몬에 큰 그룹을 가진다(Jurenka, 2015). 이는 곤충의 전 발육단계에서 섭식, 소화, 배설, 순환, 번식, 탈피/변태, 지방체 항상성 등 생존에 필요한 다양한 생리적 기능과 행동을 조절하는데 관여하고 있다(Caers et al., 2012; Yeoh et al., 2017; Nassel and Zandawala, 2019) 이 중 신경호르몬 일종인 PRXamide(NH₂) 펩타이드가 있으며 카르복실기 끝에 PRXamide(X, 다양한 아미노산)라는 공통 아미노산 서열을 가진다(Jurenka, 2015). 곤충의 PRXamide 신경호르몬은 다양한 생물학적 기능에 관여하며 호르몬의 구조와 기능에 따라 3가지로 분류된다. Pyrokinin(PK)계열 호르몬은 페로몬 생합성 활성화 신경펩타이드(pheromone biosynthesis activating neuropeptide; PBAN) 및 휴면 호르몬(diapause hormone, DH, trpPK), 카파(CAPA)펩타이드 호르몬, 탈피촉진 호르몬(ecdysis trigger hormone, ETH)이 있다(Choi, 2021). 각 신경호르몬은 G-단백질 결합 수용체(GPCRs)와 결합하며(Choi, 2021), 곤충의 생리적인 과정에 관여된 부분은 해충방제를 위한 표적으로 활용할 수 있다.

본 연구는 꽃노랑총채벌레의 페로몬 물질과 페로몬생합성에 관련된 생리활성 펩타이드의 특성 구명을 통해 곤충생리를 응용한 새로운 방제기술을 개발하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시충 사육

꽃노랑총채벌레는 insect breeding dish($\varnothing 100 \times 90$ mm)에 강낭콩 떡잎을 먹이 및 산란처로 공급 후 1일 간격으로 강낭콩 떡잎을 교체하며 채란을 하였다. 채란 한 떡잎에서 유충 부화하면 추가적으로 강낭콩 떡잎을 먹이로 공급하여 성충까지 사육 하였으며 새로 우화한 성충은 분리하여 insect breeding dish($\varnothing 100 \times 90$ mm)에 강낭콩 떡잎을 공급하며 누대 사육하였다. 사육 조건은 온도 25 ± 1 °C, 상대습도 60 ± 5 %, 광주기 16L:8D 이었다.

나. 꽃노랑총채벌레 생리활성 펩타이드의 생리활성기능 구명

연구에서 실험에 사용된 생리활성 펩타이드는 95 % 이상의 순도로 Peptides 2.0(Chantilly, VA, USA)에서 합성하였다. 시험에 사용한 생리활성 펩타이드는 윤 등 (2022)의 연구에서 보고된 꽃노랑총채벌레의 Pyrokinin, CAPA의 아미노산 서열을 기반으로 예상되는 절단부위(cleavage site)에 따라서 long type, short type을 고려하여 합성하여 활성검정에 사용하였다(표 1). 노린재목과 총채벌레목이 가장 가까운 목(目)이라는 점(Ishiwata et al, 2011)을 고려할 때, 총채벌레 펩타이드가 노린재목 곤충의 동일 수용체 계열을 교차 활성화할 수 있을 것이라고 가설을 세우고 썩덩나무노린재의 수용체를(GPCR) 대상으로 sf9세포에 수용체를 발현시켜 생리활성을 검정 하였다. 썩덩나무노린재의 CAPA수용체(CAPA-R)는 HalhaCAPA-R, trpPK수용체(trpPK-R, PK1-R)는 HalhaPK-R3b, PK수용체는 HalhaPK-R2로 세 가지 수용체(GPCR)(Ahn et al., 2020)에 *capa* 및 *pyrokinin* 유전자에서 예측된 꽃노랑총채총채벌레 생리활성 펩타이드(PRXamide)를 생리활성 검증하였다. 결합 분석(Binding assay) 2일 전에, 현탁 배양된 sf9 세포 50,000개(각각 HalhaCAPA-R(CAPA-R), HalhaPK-R3b(PK1-R), HalhaPK-R2 (PK2-R)를 발현)를 흑색 96웰 플레이트(Corning C3603, Corning, NY, USA)의 각 웰에 분주하고, 28°C에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 플레이트에서 배지를 제거한 뒤, 세포에 2.5 mM 프로베네시드(probenecid)가 포함된 FLIPR Calcium 6 시약(Molecular Devices, San Jose, CA, USA) 95 μ l를 처리하고 암조건에서 28 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. Calcium 6 시약이 처리된 세포는 FlexStation 3 마이크로플레이트 리더기(Molecular Devices)로 옮겨져, 펩타이드와 음성대조군인 물(5 μ l)을 처리 전과 처리 후의 형광 세기(Δ fluorescence)를 측정하였다(excitation: 485 nm, emission:525 nm). 플레이트의 각 웰의 웰로부터 형광 세기 측정은 5초 간격 2분30초간 수행하였으며, 펩타이드는 실험 시작 후 30초에 자동 피펫을 통해 5 μ l 처리하였다. 2분 시점에는 양성대조군으로 칼슘 활성화 확인을 위해 20 μ M 아이오노마이신(ionomycin) 5 μ l를 처리하였다. 기초 형광값은 펩타이드 처리 전 각 웰에서 25초 동안의 5개 시점을 측정하여 평균으로 설정하였고, 펩타이드 처리 후 반응은 이 기초값에 대한 형광 세기의 증가 비율(%)로 나타

내었다. 초기 스크리닝에서는 다양한 펩타이드 대상으로 각 수용체(GPCR)에 대해 각 펩타이드를 500 nM 단일 농도로 처리하여 검정하였다. 초기 스크리닝 결과를 바탕으로 선발된 펩타이드의 농도-반응 분석(Dose-response assay)을 위해 3배수 연속 희석하여 8반복으로 농도별 형광 세기 측정을 통하여 EC_{50} 값을 산출하였다.

표 1. 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드(Pyrokinin, CAPA)

Peptide	Aminio acid sequence
FraocPK1	DLVTQVLQPGQTVWFGPRL
FraocPK1L	GQDLAEKGLTRDLVTQVLQPGQTMWFGPRL
FraocPK2-1	SEGNLVNFTPRL
FraocPK2-1L	SPTPCDSSDINCLLSNIANGGSNYAPSEQEQRSRSEGNLVNFTPRL
FraocPK2-2S	TDSEPTWGFSPRL
FraocPK2-2	ESGEQPEDLEGSMGGAATSRQLRTDSEPTWGFSPRL
FraocCAPAPK2-1	VASWMPSSSPRL
FraocCAPAPK2-2	DSASFTPRL
FraocCAPAPVK1	EVQGLFPFPRV
FraocCAPAPVK2	QGLIPFPRV
HalhaPK1	NGASGNGGLWFGPRL
HalhaPK2-3	FYAPFSPRL
HalhaCAPA PVK2	EQLIPFPRV

다. 꽃노랑총채벌레의 냄새수용체 탐색

꽃노랑총채벌레의 냄새수용체 탐색을 위하여 꽃노랑총채벌레 더듬이의 전사체 분석을 수행하였다. 전사체 분석에 필요한 더듬이는 드라이아이스 위에 유리 플레이트를 올려놓아 약 -80°C 온도 조건에서 미침을 이용하여 머리에서 더듬이를 분리하고 분리한 더듬이 약 1,500개를 1.5 ml 튜브에 샘플링 하였다. 더듬이 샘플링은 암컷, 수컷 분리하여 진행하였으며 전사체분석을 위해 성별 간 2개의 더듬이 샘플을 만들었으며 더듬이 샘플은 RNA 추출 전까지 -80°C 의 초저온냉동고에 보관하였다. 더듬이 샘플은 RNA는 Quick-RNA Tissue & Insect Microprep kit(Zymo Research, USA)을 이용하여 추출하였고 추출된 더듬이RNA는 Psomage, Inc (USA)사에 의뢰하여 전사체분석을 수행하였다.

라. 꽃노랑총채벌레의 페로몬 특징 구명 및 효과검정

1) 꽃노랑총채벌레의 페로몬 구성물질 및 특성 검정

꽃노랑총채벌레의 페로몬은 SPME(Solid Phase Micro Extraction)를 이용하여 Fiber에 페로몬 물질을 흡착시킨 후 GC-MSD를 이용하여 분석하는 방법으로 수행하였다. 꽃노랑총채벌레의 암컷과 수컷의 페로몬 구성물질을 분석하기 위해 암컷과 수컷별로 4 ml vial에 우화 2일차 성충 30마리를 강낭콩 떡잎 조각과 함께 접종 후 vial 입구를 파라필름으로 밀봉하였다. 이후 스탠드에 SPME holder를 고정한 후 vial 내부에 fiber가 노출되게 한 뒤 24시간 동안 페로몬 물질을 포집하였으며 포집 시 온습도 조건은 사육환경과 동일한 조건에서 포집하였다. 처리 24시간 후에 SPME를 수거하여 GC-MSD를 통하여 포집된 페로몬 물질을 분석하였다. 꽃노랑총채벌레 성충의 연령별 페로몬 구성물질 검출 정도를 분석하기 위해 우화 0, 1, 2, 3일차의 수컷 30마리를 페로몬 구성물질 분석방법과 동일하게 수행하였다. 지역 간 꽃노랑총채벌레 페로몬 물질 분석은 한국집단과 미국집단의 우화 2일차의 수컷성충 30마리를 페로몬 구성물질 분석방법과 동일하게 수행하였으며 시험은 각 지역에서 진행하였고 사용된 재료와 GC-MSD의 분석조건은 동일하게 설정하여 수행하였다.

2) 꽃노랑총채벌레의 페로몬 구성성분의 행동반응과 유인효과 검정

꽃노랑총채벌레의 페로몬 구성성분에 따른 행동반응을 검정하기 위해 단일 물질을 1, 10, 100 ng, 1, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 hexane을 용매로 하여 제조하여 물질의 농도별 행동반응을 관찰하였다. Y-튜브 olfactometer를 이용한 행동반응 검정은 유리로 제작된 Y-튜브(길이: 10 cm, 팔 길이: 8 cm, 내경: 1 cm)를 이용하여 수행하였다. 각 팔 끝에는 활성탄 필터로 정화된 공기를 유입시킬 수 있도록 하였다. 공기의 유량은 유량계(flow meter)를 이용하여 각각 300 ml/min으로 유지하였다. 처리구와 대조구는 각각 Y-튜브의 양쪽 팔 끝에 위치시키고, 시험 물질은 필터페이퍼(1 × 1cm)에 1 μl 처리 후 투입하였다. 필터페이퍼를 유리 챔버에 넣고 시험물질 1 μl 를 필터페이퍼에 처리하였다 유리챔버는 Y-튜브와 연결하여 외부의 냄새가 Y-튜브 내부로 유입되도록 하였다. 장치는 포토박스 내에 설치하였으며, 환경조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 10\%$, 박스 내 조도는 약 1500 lux로 유지하였다. 1회 처리에 꽃노랑총채벌레 성충 1마리를 Y-튜브 하단에 접종 후 5분간 해충이 물질에 반응하여 두 팔 중 한 쪽으로 이동할 수 있도록 하였다. 개체가 특정 팔로 진입한 후 30초 이상 머무를 경우 해당 방향을 선택으로 간주하고 선택하지 않은 개체는 무반응으로 처리하였다. 행동반응 시험 시 Y-튜브의 처리와 무처리는 위치를 교체하여 위치편향의 영향을 제외하였다. 행동분석은 암컷과 수컷을 나누어서 행동반응을 관찰하였으며 물질의 농도 당 20마리 씩 3반복으로 수행하였다. 물질의 농도당 시험 종료 후 Y-튜브관련 실험도구는 100 % 에탄올로 세척 후 건조하여 재사용 하였다.

꽃노랑총채벌레 페로몬 물질 조합에 따른 유인효과 검증을 위해 표 2와 같이 페로몬

물질 조합을 설정하고 페로몬 물질은 hexane을 용매로 하여 단일 페로몬 물질 비율 검정 결과를 토대로 조합을 하였다. 조합된 페로몬물질 처리를 위해 hexane으로 세척된 rubber septa를 이용하였으며, 조합된 페로몬 물질 100 μ l를 rubber septa에 처리 후 2시간 동안 상온에서 침적시켜 루어를 제작하였다. 루어는 조합별로 물질들이 혼합되지 않게 알루미늄 호일로 포장 후 유리보트에 넣어 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 시험에 사용하였다. 황색끈끈이트랩(15 $\times$ 25 cm)에 루어를 고정하여 가지 하우스에 6개 구역에 설치를 하였으며 위치에 의한 효과를 제어하기 위해 1일 간격으로 각 루어와 황색끈끈이트랩 위치를 이동시키며 7일 동안 페로몬 조합별 루어의 유인효과를 검정하였다.

표 2. 꽃노랑총채벌레 페로몬 물질의 조합

페로몬 물질	A	B	C	D	E
#1(무처리, hexane)	-	-	-	-	-
#2	0	0	0	0	0
#3	0	-	0	0	0
#4	0	-	-	0	0
#5	-	-	-	0	0
#6	-	0	-	0	0

마. 꽃노랑총채벌레 생리활성 펩타이드 및 합성펩타이드의 영향 조사

1) 펩타이드의 생리활성검정을 위한 미세주입법 정립

꽃노랑총채벌레는 매우 작은 곤충으로 마취하여 주입처리 시 마취에 의한 영향이 다른 큰 곤충에 비해 크게 나타나는 단점이 있어 마취과정 없이 꽃노랑총채벌레를 고정하는 방법을 고안하였다. 고정방법으로는 vaccum stage를 제작하여 압력으로 고정하는 방법을 정립하였다. 시험에 사용하는 vaccum stage는 페트리접시, 고무자갈, 고무튜브 (외경 6 mm, 두께 1 mm), 메시천(mesh), 파라필름 등을 활용하여 제작하였다. 페트리접시 윗면과 측면에 6 mm의 구멍을 만든 뒤 고무튜브가 들어갈 자리를 남겨두고 내부에 고무자갈을 채우며 고무튜브가 들어갈 자리를 비워두었다. 자갈이 채워진 페트리접시를 파라필름으로 감싸고 구멍 주변이 단단히 밀봉되도록 한 뒤 구멍측면에 고무튜브를 삽입하여 윗면으로 나오게 하였고 윗면의 고무튜브 단면을 메시천으로 감싸 미세주입처리를 위한 stage로 만들었다. 측면의 고무튜브는 어댑터를 통해 진공펌프와 연결하여 stage가 진공에 의해 꽃노랑총채벌레를 고정시킬 수 있게 하였다. 꽃노랑총채벌레 미세주입 처리 시 최적 부위를 선정하기 위해 가슴과 복부에 10 μ l의 증류수를 주입하였고 미세주입을 하지 않은 총채벌레를 무처리로 설정하여 각 처리별 10마리의 총채벌레를 3반복으로 처리 후 insect breeding dish(외경 95 mm $\times$ 높이 40 mm)에 옮겨 강낭콩 떡잎을 공급해주고 24, 48시간 후 생충수를 조사하였다.

2) 펩타이드의 생리활성검정을 위한 섭식검정법(Feeding Assay) 정립

꽃노랑총채벌레에 생리활성 펩타이드를 경구로 처리하기 위해 적절한 섭식검정법(Feeding assay)이 필요하였다. 섭식검정에 필요한 생물검정 용기는 1.5 ml conical 튜브를 선정하였고 시험 처리기간 동안 영양분에 의한 꽃노랑총채벌레의 생존에 영향을 줄이기 위하여 1, 2, 3, 4, 5 %의 설탕물, 증류수를 처리로 하여 설탕물의 농도에 따른 생존율을 비교하였다. 각 처리별 꽃노랑총채벌레 20마리 3반복으로 1.5 ml conical 튜브 바닥에 1 μ l의 설탕물을 처리하고 꽃노랑총채벌레 성충 1마리를 접종하고 튜브의 뚜껑을 닫은 뒤 7일 동안 1일 간격으로 생존율을 조사하였다.

3) 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드 기반 합성펩타이드의 효과

생리활성 펩타이드 기반 합성펩타이드는 95 % 이상의 순도로 Peptides 2.0(Chantilly, VA, USA)에서 합성하였다. 먼저 세포수준에서 활성을 검정 하였으며 수용체가 발현된 sf9세포를 배양하여 사용하였다. 시험방법은 앞서 꽃노랑총채벌레 생리활성 펩타이드의 생리활성기능 구명에서 수행한 방법으로 검정하였으며 500 nM의 천연펩타이드와 합성펩타이드를 처리 후 1분30초간 형광 세기를 측정하였다. 이후 500 nM 천연펩타이드를 처리 한 후 1분30초간 형광 세기를 측정하여 이를 통해 합성펩타이드가 길항제(antagonist) 및 작용제(agonist)의 역할을 하는지 분석하였다.

합성펩타이드 및 천연펩타이드를 꽃노랑총채벌레 성충에 본 연구에서 정립한 미세 주입법을 이용하여 처리하고 1, 24시간 후 사충율을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 꽃노랑총채벌레 생리활성 펩타이드의 생리활성기능 구명

썩덩나무노린재의 CAPA 수용체(HalhaCAPA-R)에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드 반응(Δ Fluorescence %)은 그림 1과 같다. HalhaCAPA-R 수용체에 대해 13종의 펩타이드를 500 nM 농도로 처리한 후, 수용체의 활성화를 형광 변화(Δ Fluorescence %)로 측정하였다. 대부분의 펩타이드가 낮은 형광 반응을 보인 반면, CAPA PVK1, CAPA PVK2, Halha CAPA PVK2는 각각 80~100 % 이상의 높은 형광 반응을 유도하였다. 특히 CAPA PVK2는 가장 높은 반응을 보여 강력한 작용제(agonist)로써의 가능성이 확인되었다.

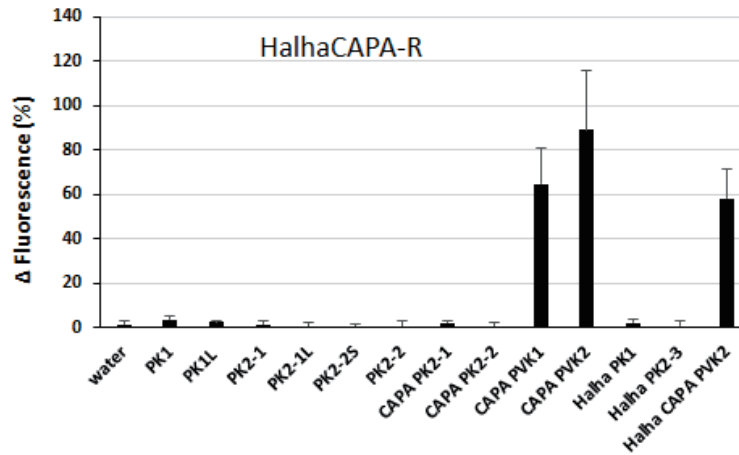


그림 1. 썩덩나무노린재의 CAPA수용체(Halha CAPA-R)에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드의 활성

썩덩나무노린재의 Pyrokinin 수용체(HalhaPK1-R, trpPK1-R)에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드 반응(Δ Fluorescence %)은 그림 2와 같다. HalhaPK1-R 수용체에 대해 13종의 펩타이드를 500 nM 농도로 처리한 후, 수용체의 활성화를 형광 변화(Δ Fluorescence %)로 측정하였다. HalhaPK-1 수용체에 대한 반응에서는 Halha PK1이 약 120%의 형광 반응을 유도하여 가장 강력한 활성 효과를 나타냈다. 또한 PK2-1도 약 80%로 비교적 높은 반응을 보였다. PK1, PK1L도 중간 수준의 반응을 나타냈으나, PK2-1L 이하 대부분의 PK2 및 CAPA 계열 펩타이드(PVK)는 반응이 미미하였다. 이는 HalhaPK1-R 수용체가 PK1 계열에 특이적으로 반응하는 수용체임을 시사한다.

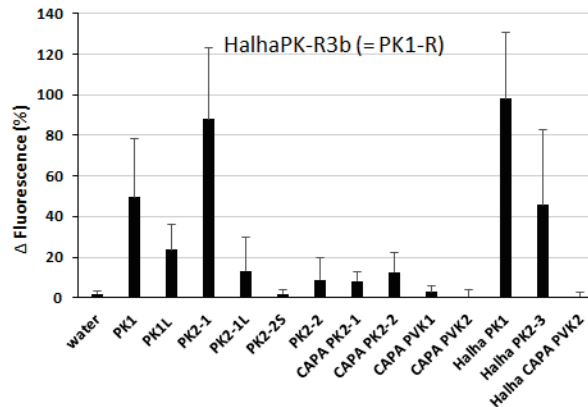


그림 2. 썩덩나무노린재의 Pyrokinin수용체(HalhaPK1-R, trpPK1-R)에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드의 활성

썩덩나무노린재의 Pyrokinin 수용체(HalhaPK2-R, PK2-R)에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드 반응(Δ Fluorescence %)은 그림 2와 같다. HalhaPK2-R 수용체에 대해 13종의 펩타이드를 500 nM 농도로 처리한 후, 수용체의 활성화를 형광 변화(Δ Fluorescence %)로 측정하였다. HalhaPK2-R 수용체는 PK2-1L에 대해 약 120 % 강한 형광 반응을 보였으며, 이는 해당 수용체의 주요 작용제 후보임을 시사한다. 또한 PK2-1, CAPA PK2-2, CAPA PVK1, PVK2는 중간 수준의 반응을 보여 부분 작용제 (agonist)로서의 가능성이 있다. 반면, PK1, CAPA PK1-2, Halha CAPA PVK2 등은 반응이 낮아 수용체 활성화 가능성이 낮다.

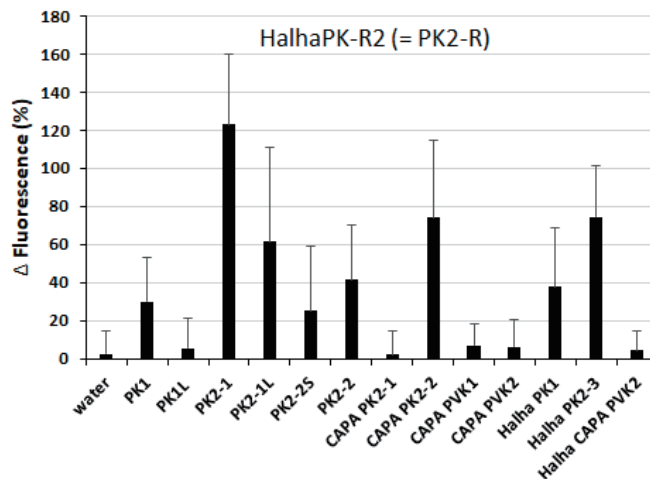
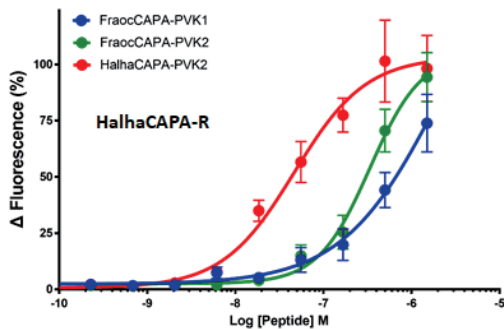


그림 3. 썩덩나무노린재의 Pyrokinin수용체(HalhaPK2-R, PK2-R)에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드의 활성

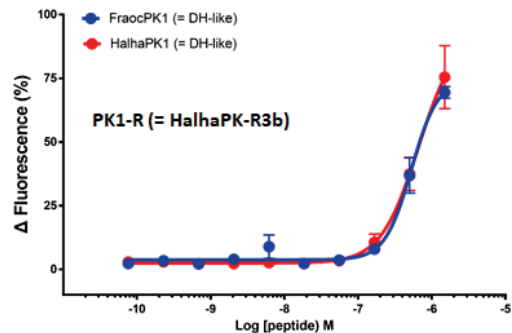
총 13종의 PRXamide 계열 펩타이드(꽃노랑총채벌레 10종, 썩덩나무노린재 3종)를 썩덩나무노린재의 세 종류 GPCR 수용체(CAPA-R, PK1-R, PK2-R)에 처리하여 활성을 분석한 결과는 그림 3과 표 3과 같다. CAPA-R 수용체는 꽃노랑총채벌레 유래 CAPA-PVK2 및 썩덩나무노린재 유래 HalhaCAPA-PVK2에 선택적으로 반응하였다. 특히 CAPA-PVK2($EC_{50} = 337 \text{ nM}$)는 CAPA-PVK1($EC_{50} > 1 \mu\text{M}$)보다 강한 활성을 보였으며, HalhaCAPA-PVK2($EC_{50} = 47 \text{ nM}$)에는 미치지 못했다. 이는 세 가지 *capa* 유전자 변이체 중 모든 변이체에서 발현되는 CAPA-PVK2가 꽃노랑총채벌레의 주요 CAPA 리간드일 가능성을 의미한다. PK1-R 수용체에서는 trpPK1과 HalhaPK1이 각각 EC_{50} 560 nM, 480 nM으로 유사한 결합 활성을 나타냈다. 반면, trpPK1의 긴 형태(trpPK1L, 31-aa)는 활성도가 매우 낮아 $EC_{50} > 1 \mu\text{M}$ 으로 측정되었다. 이는 꽃노랑총채벌레에서 trpPK 펩타이드의 활성형이 짧은 형태(20-aa)임을 의미하며, 다른 곤충들에서도 trpPK는 보통 20~24개의 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드임을 고려할 때 타당한 결과로 해석된다(Choi, 2022). PK2-R 수용체는 PK2-1, CAPA-PK2, HalhaPK2-3 등에 강한 반응을 보였다. PK2-1은 긴 형태인 PK2-1L(46-aa)에 비해 약 10배 높은 활성을 나타냈으며(EC_{50} : 19 nM vs. 211 nM), 실제 기능하는 활성 펩타이드는 짧은 형태로 추정된다. PK2-2 계열에서 긴 형태 PK2-2(36-aa)는 짧은 형태PK2-2S(13-aa)보다 약 2배 높은 활성(EC_{50} : 122 nM vs. 295 nM)을 보여주며, 긴 형태가 활성 리간드로 보인다. 이 펩타이드는 PBAN 유사 서열을 가지며, 곤충류에서 가장 긴 PBAN 중 하나로 추정된다(Choi, 2022). 본 시험 결과는 bioinformatic 기반 활성펩타이드의 예측의 한계가 있음을 보여준다. 전구펩타이드 내의 다수 절단 부위로 인해 실제로 기능하는 활성 펩타이드는 다양하게 존재할 수 있으며, 수용체와의 결합실험을 통해 생리적으로 중요한 펩타이드를 도출하는 것이 매우 중요하다.

본 연구는 썩덩나무노린재 수용체를 활용하여 꽃노랑총채벌레 유래 PRXamide 펩타이드의(CAPA, PK=Pyrokinin) 생리활성 가능성을 교차 분석한 결과로서, CAPA 및 Pyrokinin 펩타이드가 각기 특이적인 GPCR에 결합하며 구조-기능 간 관계가 잘 보존되어 있음을 확인하였다(Ahn et al., 2020). 본 연구에서 검증한 PRXamide 계열의 CAPA 및 Pyrokinin 펩타이드는 곤충의 삼투 및 수분 조절, 배설, 섭식 조절 등 생리학적인 기능에 관여하므로(Paluzzi, 2012; Van Hiel et al., 2010), 이들 펩타이드나 수용체를 표적으로 하는 길항제 또는 작용제는 총채벌레와 같이 흡즙성 해충에 대한 선택적 방제 전략으로 활용될 수 있다. 총채벌레는 물리적 피해 외에도 식물 바이러스를 전파하는 매개체이므로, 이러한 분자 메커니즘 기반의 생리 활성 제어 기술은 생물학적 방제의 새로운 가능성을 보여준다.

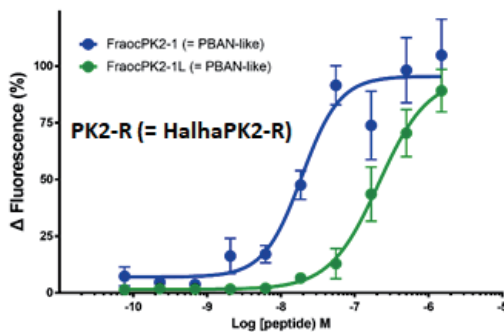
A)



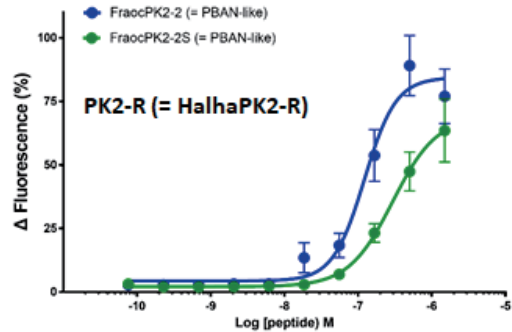
B)



C)



D)



E)

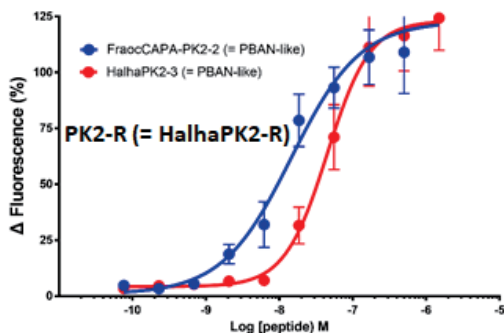


그림 3. 썩덩나무노린재의 CAPA, Pyrokinin 수용체에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드의 농도별 활성정도 (A)CAPA-PVK 펩타이드_CAPA수용체(Halha CAPA-R), (B)PK-1펩타이드_Pyrokinin수용체(HalhaPK1-R, trpPK1-R), (C)PK2-1펩타이드_Pyrokinin수용체 (HalhaPK2-R, PK2-R), (D)PK2-2펩타이드_Pyrokinin 수용체(HalhaPK2-R, PK2-R), (E)CAPA-PK펩타이드_Pyrokinin수용체(HalhaPK2-R, PK2-R)

* CAPA PVK, CAPA periviscerokinin(PVK); PK, pyrokinin(PBNA)

표 3. 썩덩나무노린재 수용체에 대한 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드 반수 영향농도(EC₅₀)

PRXamide	Petide	CAPA-R	PK-1R	PK-2R
CAPA-PVK	FraCoCAPA-PVK1	>1 μ M	>1 μ M	>1 μ M
	FraCoCAPA-PVK2	337 nM	>1 μ M	>1 μ M
	HalhaCAPA-PVK1	47 nM	>1 μ M	>1 μ M
trpPK(=DH-like, PK1)	FraCoTrpPK1	>1 μ M	480 nM	>1 μ M
	FraCoTrpPK1L	>1 μ M	>1 μ M	>1 μ M
	HalhaPK1	>1 μ M	560 nM	>1 μ M
	FraCoPK2-1	>1 μ M	>1 μ M	19 nM
	FraCoPK2-1L	>1 μ M	>1 μ M	211 nM
Pyrokinin (=PBAN-like, PK2)	FraCoPK2-2	>1 μ M	>1 μ M	122 nM
	FraCoPK2-2S	>1 μ M	>1 μ M	295 nM
	FraCoCAPA-PK2-1	>1 μ M	>1 μ M	>1 μ M
	FraCoCAPA-PK2-2	>1 μ M	>1 μ M	15 nM
	HalhaPK2-3	>1 μ M	>1 μ M	45 nM

※ a amide C-termini; CAPA-PVK, CAPA-periviscerokinin; FraCo(꽃노랑총채벌레); Halha(썩덩나무 노린재) PK, pyrokinin; trpPK, tryptophan pyrokinin(DH, Diapause Hormone)

나. 꽃노랑총채벌레의 냄새수용체 탐색

꽃노랑총채벌레 더듬이의 냄새수용체 탐색을 위한 전사체분석(transcriptome analysis)의 결과는 그림 4와 같다. 암컷과 수컷의 유전자 발현수준 분포에서는 암컷과 수컷 모두 2~6범위의 발현수준을 가진 유전자가 높은 빈도로 나타났다. 전체적으로 유전자 발현분포는 암컷과 수컷이 유사한 특징을 보이거나 발현수준이 4~5범위에서 암컷의 유전자가 많이 발현되는 경향을 나타내었다. 발현수준이 9이상의 고발현 범위에서 암컷과 수컷의 유전자는 낮은 빈도로 나타났다. 차등 발현된 유전자 수(Up, Down regulated count)에서 통계적으로 유의미한 발현에 차이가 나는 유전자는 총 1,949개로 암컷을 기준으로 수컷에서 많이 발현되는 유전자는 742개, 암컷에서 많이 발현되는 유전자는 1,207개로 나타났다. 이는 즉 수컷 대비 암컷의 더듬이에서 발현되는 유전자가 수치적으로 높게 나타났고, 암컷이 후각과 감각에 관련한 다양한 유전자를 발현하고 이와 관련한 수용체가 암컷에 더 중요하게 작용할 수 있는 가능성을 보여 준다. 또한 유전자의 발현 정도와 후각 수용체의 관계를 검증하기 위해 추가적인 분석을 통해 더듬이 내 후각 및 감각관련 수용체 유전자를 탐색하고 이 수용체를 발현시켜 화학적인 작용이 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

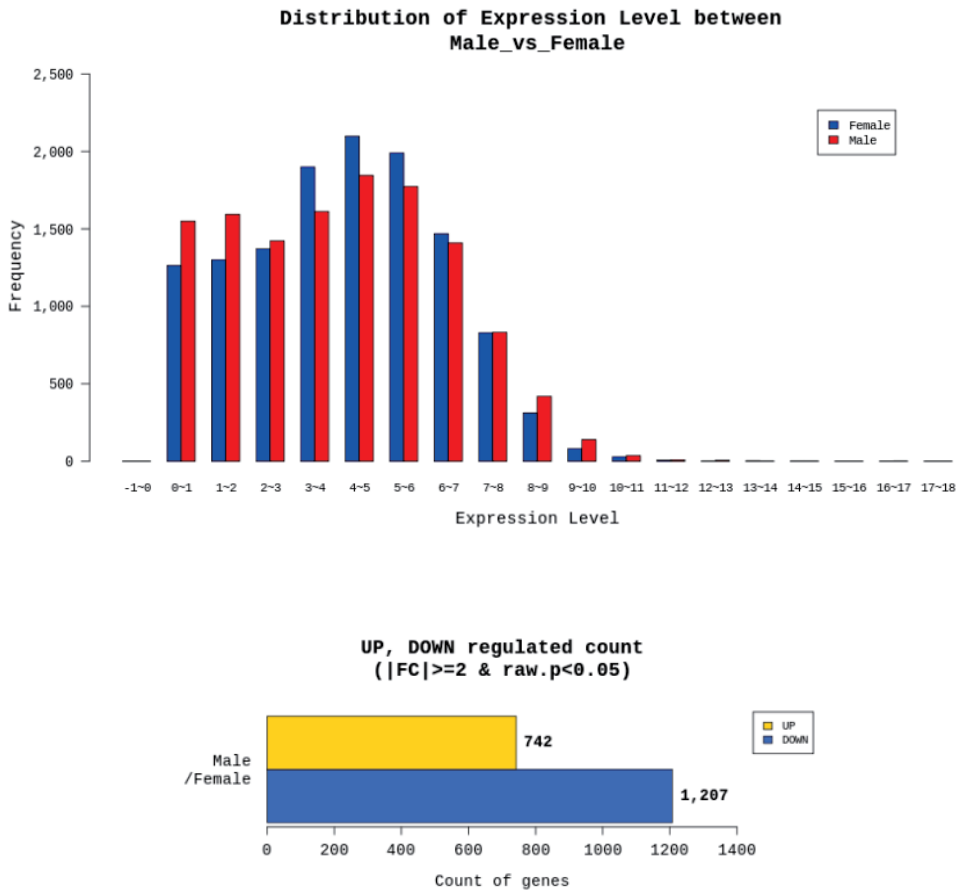


그림 4. 꽃노랑총채벌레의 더듬이의 전사체 분석 결과

다. 꽃노랑총채벌레의 페로몬 특징 구명 및 효과검정

1) 꽃노랑총채벌레의 페로몬 구성물질 및 특성 검정

SPME를 이용하여 꽃노랑총채벌레가 외부에 방출하는 휘발성물질(페로몬)을 포집하고 GC-MSD를 이용하여 암컷과 수컷간의 peak패턴을 확인한 결과 암컷과 수컷간의 패턴에 차이가 있었다. 또한 GC-MS에서 검출된 각 peak를 라이브러리로부터 정성 분석을 수행한 결과 꽃노랑총채벌레의 페로몬 물질로 추정되는 알콜, 케톤, 알데하이드, 에스테르기를 가지는 물질 7종이 수컷에서만 검출 되었고 암컷에서는 검출되지 않았다(표 4). 이는 꽃노랑총채벌레의 페로몬은 수컷이 방출하는 성페로몬으로 확인 할 수 있으며 본 연구에서 수행한 꽃노랑총채벌레 더듬이 전사체 분석에서 암컷의 더듬이에 수컷 대비 많은 유전자가 발현되며 이에 따른 냄새수용체 발달되었을 것으로 추정되는 결과와 대조하였을 때 암컷과 수컷의 교미에 중요한 역할을 수행하는 것으로 판단된다.

표 4. 꽃노랑총채벌레의 암컷, 수컷에 따른 페로몬 구성물질 검출 유무

처리샘플	A	B	C	D	E	F	G
떡잎(무처리)	-	-	-	-	-	-	-
수컷	0	0	0	0	0	0	0
암컷	-	-	-	-	-	-	-

꽃노랑총채벌레의 수컷연령에 따른 7종의 페로몬 물질의 검출 정도(%)를 분석한 결과 대부분의 페로몬 물질이 연령이 증가할수록 검출되는 정도가 증가하는 경향을 나타 내었다(표 5). 7종 물질 중 A, D, F 물질은 0일차 에는 각각 22.2 %, 22.2 %, 44.4 %의 비교적 낮은 검출정도를 보였으나, 3일차에 이르러 각각 57.1 %, 57.1 %, 100 %로 연령이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. F는 모든 처리 일차에서 검출되어 주 페로몬 물질로 보여진다. B, C 물질의 경우 초기에는 검출되지 않거나 (0%), 매우 낮은 수치를 보였으나 1일차 이후부터 점진적인 증가가 나타났다. C는 1일차에 33.3 %로 급격히 증가했으며, 2일차에 40 %로 최대치를 기록한 뒤 3일차에 다소 감소(28.6 %)하였다. 반면 B는 2일차에 20 %, 3일차에 14.2 %로 낮은 검출정도를 보였다. E 물질은 0일차부터 이미 88.8 %로 높은 검출 정도를 보였으며, 3일차에는 100 %로 검출되었다. 이는 E가 0일차부터 검출되어 주 페로몬 물질로 추정된다. 마지막으로 G 물질은 모든 일차에서 100 %의 검출정도를 보였으며 G 물질 또한 주 페로몬 물질로 추정된다. 다만 물질 D와 E는 검출이 되었으나 GC-MSD 라이브러리 상 물질의 매칭 정확도가 낮은 경향을 보여 향후 시험에서 제외 하였다.

이상의 결과는 페로몬 구성 물질이 수컷의 연령 별 방출에 대한 특성을 보여주며, 연령별 페로몬 물질의 방출 특성에 따라 꽃노랑총채벌레의 교미 및 집단행동 등을 분석과 페로몬 물질의 최적 조합 설정의 기초 자료로 활용될 수 있다.

표 5. 꽃노랑총채벌레의 수컷연령에 따른 페로몬 구성물질 검출 정도 (%)

처리일차	A	B	C	D	E	F	G
0 일차	22.2	0	0	22.2	88.8	44.4	100
1 일차	33.3	0	33.3	33.3	77.7	88.8	100
2 일차	50	20	40	40	90	90	100
3 일차	57.1	14.2	28.6	57.1	100	100	100

꽃노랑총채벌레의 지역별 집단(한국, 미국)간 페로몬 물질은 동일하게 검출 되었다. 다만 각 물질을 구성하는 비율에서는 두 집단 간의 차이가 있었다(표 6). Huh et al. (2008)의 연구에서 톱다리개미허리노린재의 지역집단별 집합페로몬의 비율을 검정한 결과 진주계통에서 (E)-2-hexenyl (Z)-3-hexenoate: (E)-2-hexenyl (E)-2-hexenoate:

Tetradecyl isobutyrate의 비율이 1:1.4:0.2, 익산계통은 1:0.8:0.2, 일본 츠쿠바계통은 1:2.8:0.2, 일본 쿠마모토계통이 1:1.5:0.1로 지역별 3가지 성분의 비율이 다르게 나타났다. 또한 Klun and Cooperators (1975)과 Löfstedt (1990)의 연구에서도 페로몬의 분비는 지리적 차이에 따라 페로몬의 분비량과 구성물질의 비율에는 차이가 있다고 밝혔다. 꽃노랑총채벌레의 페로몬을 효과적으로 이용하기 위해서 지역별 야외집단의 페로몬 물질 구성비율을 확인하는 추가적인 연구가 필요하며 페로몬 각 물질의 구성 비율 확인과 유인력 검정을 통해 최적 조합을 설정하면 효과적인 꽃노랑총채벌레의 유인제로 활용이 가능할 것으로 보인다.

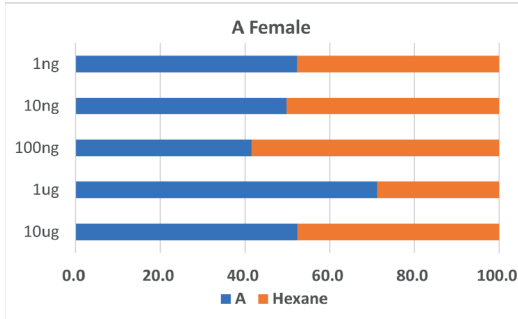
표 6. 꽃노랑총채벌레의 지역에 따른 페로몬 구성물질 비율 차이

집 단	A	B	C	F	G
한국집단	2.91	0.84	0.27	4.21	91.28
미국집단	1.12	2.13	0.52	3.95	92.28

2) 꽃노랑총채벌레의 페로몬 구성물질의 행동반응과 유인효과 검정

꽃노랑총채벌레의 페로몬을 구성하는 단독 물질 A와 B에 대하여 농도별 Y-튜브를 이용하여 암컷과 수컷의 유인/기피 행동반응을 분석한 결과는 그림 5, 6과 같다. A물질에서 1 µg/µl 농도에서 암컷은 유인반응을 나타내었으며 수컷은 10 µg/µl 농도에서 기피반응을 나타내었다. B물질에서 암컷은 처리 농도에 따른 특이적인 행동반응을 보이지 않았다. 수컷은 1 µg/µl 농도에서 기피반응을 나타내었다. 꽃노랑총채벌레는 단일 페로몬 물질 농도에 따라 암컷과 수컷에서 다른 반응을 보였는데 이는 더듬이 전사체 분석 결과와 관련하여 보면 후각 수용체의 감도에 따른 암수간의 반응차이로 보여진다. 암컷과 수컷의 반응차이는 곤충의 미세한 화학적 의사소통 체계를 나타내며 페로몬을 구성하고 있는 물질들을 조합하여 페로몬 제조 시 각 물질의 적절한 구성 비율, 적정 농도 등을 고려하여 유인/기피 행동을 효과적으로 유도하도록 설계가 되어야 하고 이에 따른 각 물질 농도에 따른 행동반응과 물질 조합에 따른 행동 반응 등의 지속적 연구가 필요하다.

A)



B)

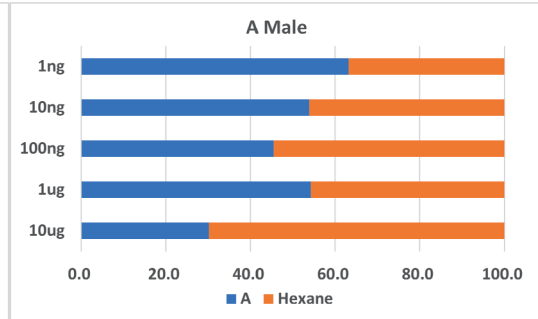
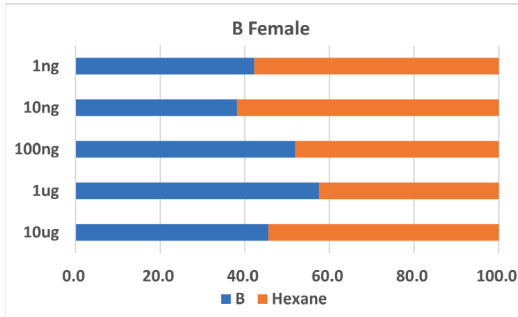


그림 5. 물질 A에 대한 꽃노랑총채벌레의 암,수별 행동반응 (A) 암컷, (B) 수컷

A)



B)

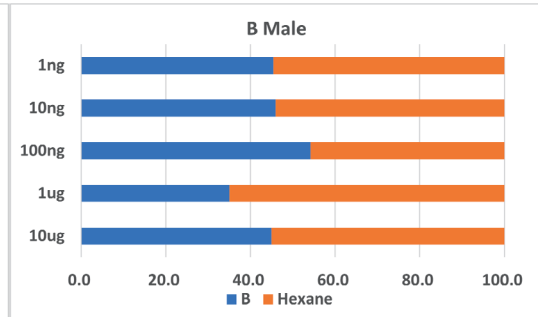


그림 6. 물질 B에 대한 꽃노랑총채벌레의 암,수별 행동반응 (A) 암컷, (B) 수컷

꽃노랑총채벌레의 페로몬을 구성하는 물질들을 5가지의 조합으로 조성하여 rubber septa로 페로몬 루어를 제작하여 유인효과를 검정 한 결과 무처리(#1)대비 5개의 조합 처리에서 유인효과를 나타내었다(그림 7). 시험 지역에 따라 각 조합에 따른 유인력은 다소 차이를 보였다. 이는 꽃노랑총채벌레 발생 초기밀도, 시험 환경(온도, 광조건 등)에 따른 루어에서 페로몬물질의 방출량 및 지속성 등에 의하여 영향을 받는 것으로 판단된다. 따라서 페로몬 구성물질에 대한 적정 조합, 페로몬 루어제작에 필요한 페로몬 물질의 처리량, 온도 및 광 조건에 따른 루어에서 페로몬 물질의 방출 정도 등에 대한 검증시험과 반복시험을 통하여 꽃노랑총채벌레 유인제 개발이 가능 할 것으로 보인다.

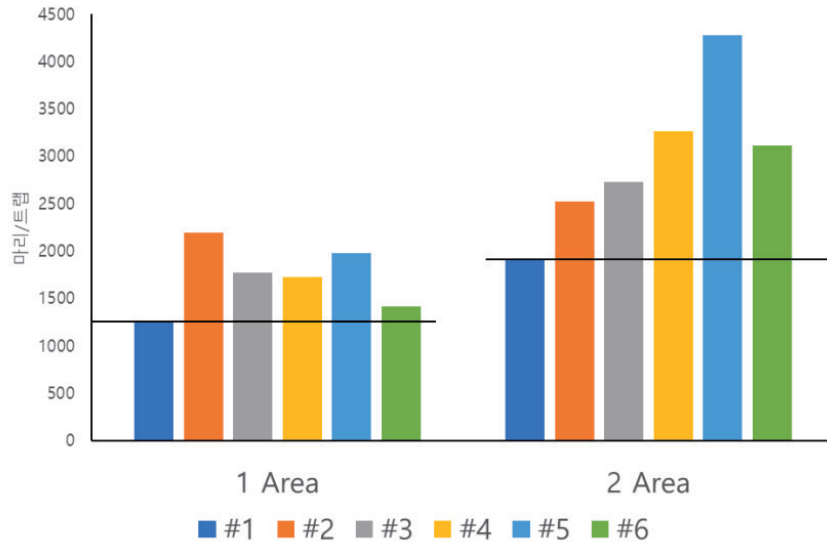


그림 7. 꽃노랑총채벌레 페로몬 성분 조합에 따른 유인력 정도

라. 꽃노랑총채벌레 생리활성 펩타이드 및 합성펩타이드의 영향 조사

1) 펩타이드의 생리활성검증을 위한 미세주입법 정립

펩타이드의 생리활성 검증을 위하여 꽃노랑총채벌레 대상 현미경, vaccum stage, 나노인젝터(Nanoliter 2020, WPD)를 이용한 미세주입 기법(그림 8)은 다음과 같다.

- ① 유리 마이크로피펫 바늘($0.5\ \mu\text{l}$, 외경 $1.14\text{mm} \times$ 높이 50mm , 팁 내경 $10\ \mu\text{m} \pm 2\ \mu\text{m}$, WPD)에 미네랄오일(Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 주입한다.
- ② 미네랄오일이 주입된 유리 마이크로피펫 바늘을 마이크로 매니플레이터에 고정한다.
- ③ 마이크로인젝터 펌프를 이용하여 주입에 필요한 펩타이드 용액 양의 미네랄오일을 배출한다.
- ④ 펩타이드 용액의 소수성 여부에 따라 vaccum stage 위에 파라필름 또는 알루미늄 포일을 올린 후 진공펌프를 가동하여 고정시킨다. 이후 유리 마이크로 피펫 바늘에 펩타이드 용액을 주입한다. vaccum stage에 남은 용액과 오일은 kimwipe로 닦아낸 뒤 파라필름 또는 호일을 제거한다.
- ⑤ 가느다란 붓(직경 1mm)을 사용하여 꽃노랑총채벌레를 Vaccum stage의 메시 위에 올려 놓는다.
- ⑥ 붓으로 꽃노랑총채벌레의 복부(Ventral side)가 위로 향하게 위치를 조정하고 (그림 9. A) 유리 마이크로피펫 바늘 끝을 가슴 부위를 조금 관통하여 20 nl/s 속도로 펩타이드 용액 10 nl 를 주입한다(그림 9. B). 주입 시, 펩타이드 용액이 체강(hemocoel)으로 들어 가면서 복부가 일시적으로 팽창하는 현상이 관찰될 수 있다. 주입 중 꽃노랑총채벌레의 반응 없이 용액이 바늘 끝에서 나온다면, 바늘이 가슴

을 관통하지 못한 것으로 주입이 실패한 것이며, 바늘을 빠르게 가슴에서 제거하면 펩타이드 용액이 가슴에서 흘러나올 수 있는데 이것도 주입에 실패한 것으로 바늘을 주입 후 몇 초간 방치 후 제거한다.

- ⑦ 펩타이드 용액 주입이 완료된 후 진공펌프 튜브의 공기흐름을 차단하고 처리가 된 꽃노랑총채벌레를 생물검정 용기로 이동시킨다.
- ⑧ 생물검정 용기에 이동된 꽃노랑총채벌레를 최소 5~10분간 관찰하며 생존여부를 확인하여 제자리에 머물고 움직이지 않는 개체는 주입과정 중 물리적 손상을 입었을 가능성이 높으므로 제거한다.

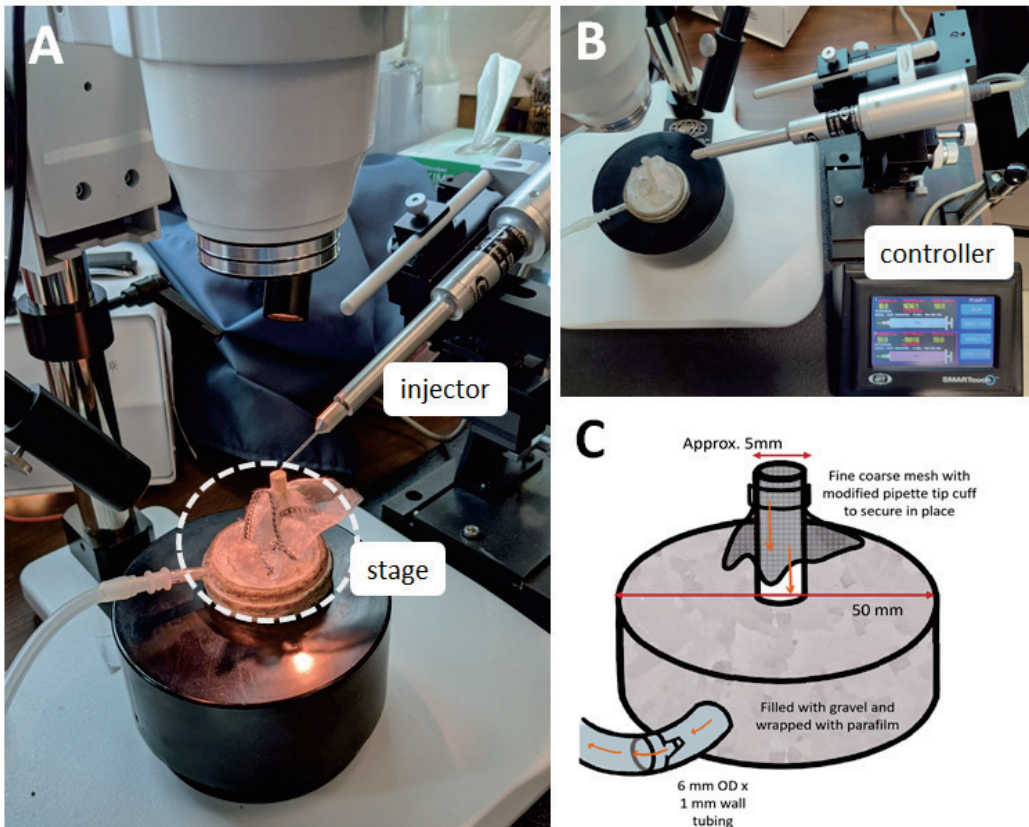


그림 8. 꽃노랑총채벌레 생리활성 펩타이드의 체내 검정을 위한 미세주입 방법 (A) Vacuum 스테이지와 Nanoliter 2020(WPI)의 injector(주입기), (B) Nanoliter 컨트롤러, (C) Vacuum 스테이지 모식도

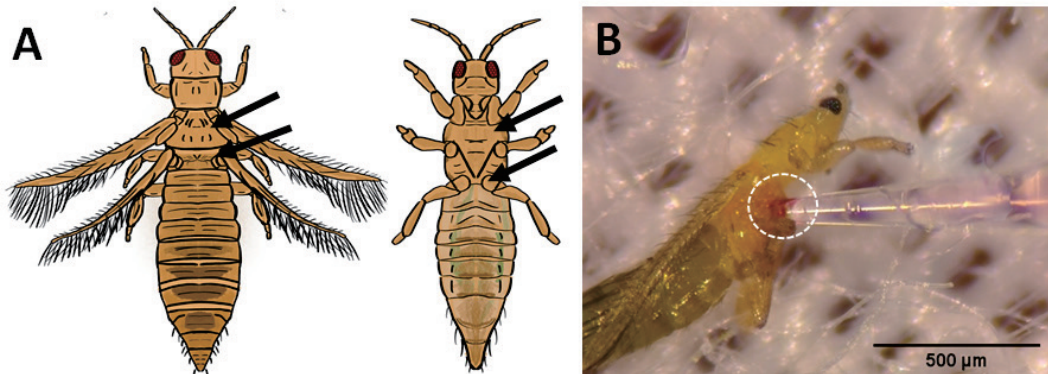


그림 9. 꽃노랑총채벌레의 미세주입을 위한 바늘의 삽입 위치 (A) 등쪽(왼쪽), 배쪽(오른쪽) 가슴 위치, 화살표는 주입바늘의 적정 위치 표시, (B) 가슴에 미세주입 바늘이 삽입된 꽃노랑총채벌레 성충

미세주입법을 이용한 꽃노랑총채벌레의 미세주입 위치에 따른 생존율에 대한 결과는 그림 10과 같다. 가슴에 주입된 꽃노랑총채벌레는 복부에 주입된 개체에 비하여 생존율이 높게 나타났다. 복부에 주입된 총채벌레는 24시간에서 생존율이 50 %로 나타난 반면 가슴에 주입된 개체는 주입되지 않은 무처리구와 유사한 수준(약 85 %)의 생존율을 보였다. 24, 48시간 사이의 생존율에는 큰 변화가 없었다. 이 결과는 꽃노랑총채벌레와 같은 미소해충을 대상으로하는 미세주입기법 시 복부보다 가슴이 생존율에 영향이 적다는 것을 의미한다. 본 연구결과를 통하여 생리활성 펩타이드 기반 합성펩타이드의 꽃노랑총채벌레의 영향 평가시험에 적용하여 후속연구를 수행하였다. 또한 본 연구에서 정립한 미세주입기법은 향후 미소곤충 대상으로 하는 연구에서 표준화된 주입기술을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

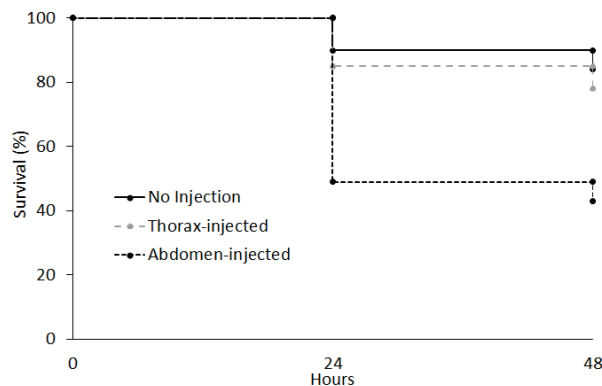


그림 10. 꽃노랑총채벌레의 미세주입 위치에 따른 생존율. Thorax; 가슴, Abdomen;복부

2) 펩타이드의 생리활성검증을 위한 섭식검정법(Feeding Assay) 정립

미세주입법은 꽃노랑총채벌레의 체강에 합성펩타이드를 직접 주입하여 영향을 확인할 수 있으나 실제 합성펩타이드가 꽃노랑총채벌레의 경구를 통하여 전장, 중장 등 소화기관을 지나 체강으로 흡수된 후의 영향을 확인해야 한다. 따라서 꽃노랑총채벌레의 생존율에 영향을 미치지 않고 합성펩타이드를 경구로 투여하는 섭식검정법(Feeding assay)에 대한 정립이 필요하였다. 섭식검정법(Feeding assay)의 처리시간 동안 꽃노랑총채벌레에 설탕물의 농도 별 생존율은 그림 11과 같다. 1.5 ml 튜브에서 물이 없는 조건(No water)에서는 처리 2일 차부터 생존율이 35 %로 급격히 감소하였으며 4일차에 모든 꽃노랑총채벌레가 사망하였다. 증류수에서는 처리 6일 차에 생존율이 53.3 %로 크게 감소하였으며 7일차에 모든 개체가 사망하였다. 설탕물의 농도 1, 2, 3, 4, 5 % 조건에서는 처리 7일차 까지 꽃노랑총채벌레의 생존율이 약 80 %이상으로 나타났다. 이상의 결과를 통하여 합성펩타이드를 1% 설탕물 용액에 용해한 후 합성펩타이드 용액을 1.5 ml 튜브에 1 μ l 처리 후 꽃노랑총채벌레 1마리를 접종하여 이후 영향을 보는 섭식검정법(Feeding assay)을 정립하였다.

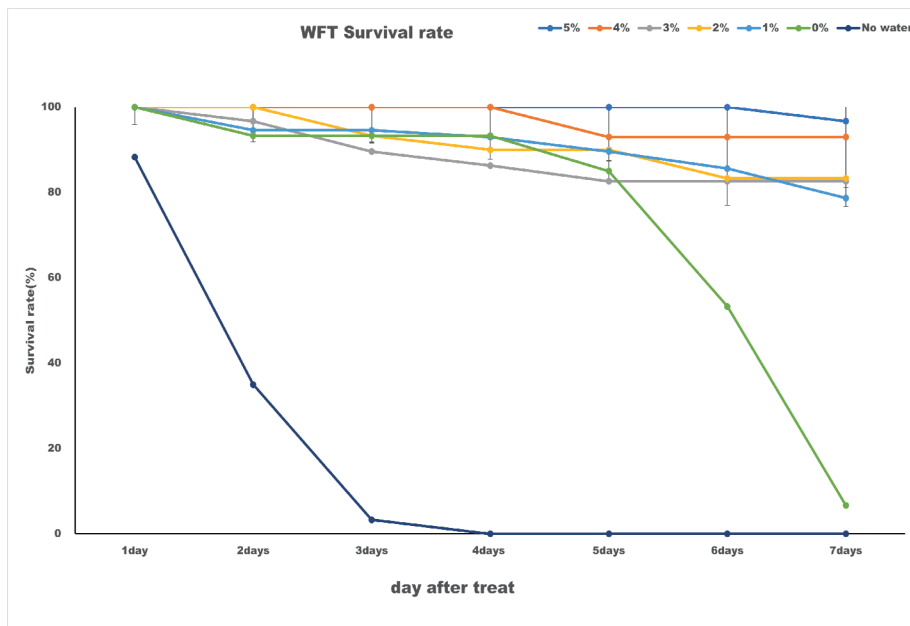


그림 11. 설탕물 농도에 따른 꽃노랑총채벌레 성충의 생존율

3) 꽃노랑총채벌레의 생리활성 펩타이드 기반 합성펩타이드의 효과

두 종류의 합성 펩타이드(Synthetic Peptide 1, 2)가 천연 펩타이드(Natural Peptide)에 대한 작용제(agonist) 또는 길항제(antagonist) 기능을 평가하기 위해 세포 주(Cell line)에서 검증을 수행하였다(그림 12). 1 μ M의 합성 펩타이드를 다양한 시간 동안 전처리한

후, 500 nM의 천연 펩타이드를 처리하고 상대 형광 변화(Δ Relative Fluorescence %)를 측정하였다. 천연 펩타이드는 한번 수용체에 처리된 이후, 다시 천연 펩타이드를 처리하였을 때 처리시간이 지남에 따라 수용체를 다시 활성화시키지 못하였다.

합성펩타이드 1은 처리시간이 지남에 따라 상대적으로 수용체의 활성이 낮아지는 경향을 보였으며, 합성펩타이드 1은 수용체에 길항제(antagonist)로 작용할 가능성이 있는 것으로 해석된다. 합성펩타이드 2의 경우, 처리시간이 증가함에 따라 수용체 활성 반응이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 일부 구간에서는 천연 펩타이드 초기처리 반응 수준의 활성도를 나타냈다. 합성 펩타이드 2는 해당 수용체에 대해 강력한 작용제(agonist)로 작용할 가능성이 높음을 시사한다. 이러한 결과는 합성펩타이드 1과 2가 서로 다른 방식으로 수용체 활성화에 영향을 미치며, 수용체에 대한 영향은 이후에 발생하는 생리과정에 교란을 유발하며 심할 경우 치사에 이르는 효과를 볼 수 있다. 세포 수준에서 확인된 수용체의 반응은 조직 및 기관수준으로 확장 할 수 있으며 생리적 교란으로 발생하는 연쇄적 반응을 통해 치사효과를 유도할 수 있는 가능성이 있다. 추가적으로 생체 내 수준에서 합성펩타이드들이 목표 수용체로 이동하고 결합을 통해 생리적 교란이 발생하는 지에 대한 검증을 위해 합성펩타이드 2종을 꽃노랑총채벌레에 미세주입하는 시험을 수행하였다.

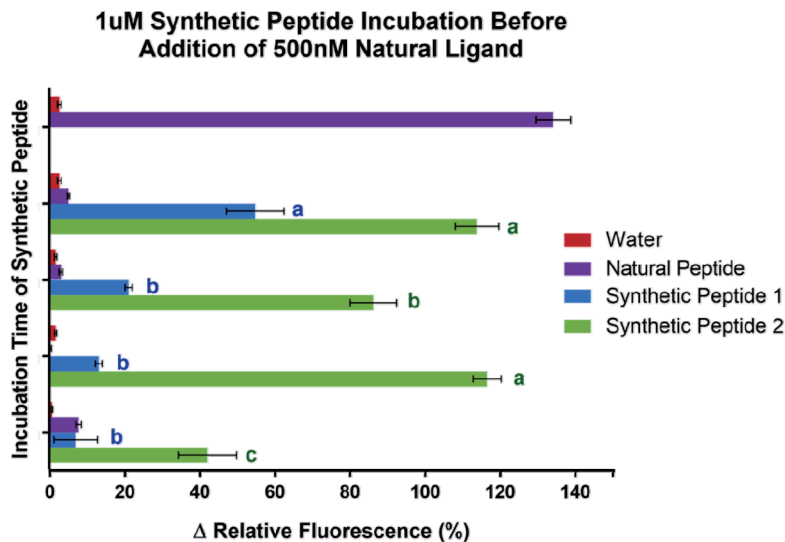


그림 12. 꽃노랑총채벌레 생리활성펩타이드 기반 합성펩타이드의 수용체의 길항제 및 작용제 기능

2종의 합성펩타이드를 꽃노랑총채벌레에 미세주입 후 나타난 영향은 그림 13과 같다. 세포수준에서 검정결과와 달리 합성펩타이드 처리구에서 살충효과가 낮게 나타났으나

반면 천연펩타이드 처리구에서는 살충효과가 나타났다. 이는 합성펩타이드가 곤충의 체강을 통해 수용체까지 도달하는 과정 중에 체강(hemocoel)내의 여러 효소 또는 곤충면역 반응에 의하여 수용체에 결합하는 부분이 손상 또는 분해되어 체내 수용체와의 결합이 이루어지지 않고 이후 일어나는 생리반응이 유도되지 않은 것으로 추정된다. 반면 천연 펩타이드는 꽃노랑총채벌레 체내에 존재하는 펩타이드이며 체강에서 수용체까지 큰 변화없이 이동하여 수용체와 결합하여 이후 생리과정에 교란이 발생하여 살충효과가 나타난 것으로 추정된다. 세포수준에서의 합성펩타이드들이 작용제 또는 길항제의 효과를 강하게 나타내더라도 곤충의 체내에 들어가서 목표 수용체에 도달 하는 과정에서 체강 내 효소, 중장의 효소, 중장벽을 통과하여 체강 내로 들어가는 과정을 통해 합성펩타이드들이 분해되어 기능을 수행하지 못할 수 있음을 설명한다. 반면 Shi et al. (2021)의 연구에서 복숭아혹진딧물 대상으로 CAPA펩타이드 기반으로 아미노산기(amino), 브롬기(bromo), 플루오르기(fluoro), 카복실기 등을 추가하여 합성펩타이드를 제작하고 섭식처리를 통해 살충효과를 확인하였다. 또한 Choi and Vander Meer (2021)의 연구에서도 합성펩타이드를 제작하여 붉은불개미(*solenopsis invicta*)에 대하여 미세주입과 섭식처리를 통하여 일부 합성펩타이드에서 살충효과를 확인하였다. 본 연구에서 사용 한 합성펩타이드가 꽃노랑총채벌레 체내 검정에서 효과를 보지 못하였으나 선행연구 사례처럼 수용체의 결합부분은 유지하며 작용기의 추가, cyclic구조 등을 추가하여 안정성과 효과를 증진시키는 합성펩타이드의 설계와 세포수준과 체내수준(미세주입 및 섭식처리)의 검정에 대한 추가적인 연구가 필요하며 효과적인 합성펩타이드는 신규 살충물질의 개발 및 살충제의 협력제 등으로 활용이 가능할 것으로 전망된다.

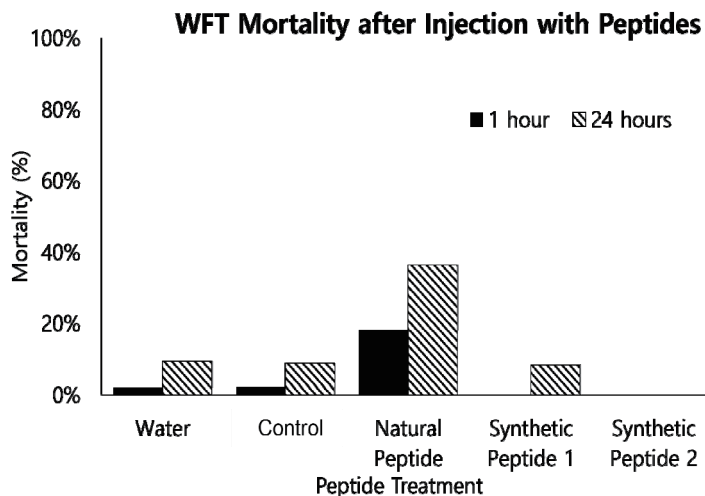


그림 13. 꽃노랑총채벌레 생리활성펩타이드 기반 합성펩타이드의 미세주입 효과

4. 적 요

본 연구는 꽃노랑총채벌레의 페로몬 생합성에 관련하는 생리활성 펩타이드인 Pyrokinin과 CAPA에 대한 세포수준에서의 활성을 검정하였으며, 페로몬과 밀접한 관련이 있는 후각수용체를 탐색하기 위하여 꽃노랑총채벌레 더듬이의 전사체분석을 하였다. 또한 꽃노랑총채벌레 페로몬의 구성성분을 찾고 특성을 구명하였으며 물질을 조합하여 루어제작 후 유인력 시험을 수행하였다. 생리활성 펩타이드 기반의 합성 펩타이드를 만들고 이에 대한 체내 영향 검정을 위한 미세주입법과 섭식처리법을 정립하였으며 세포수준과 체내 수준에서 합성펩타이드의 효과 검정을 수행한 연구결과는 다음과 같다.

- 가. 꽃노랑총채벌레의 CAPA, Pyrokinin의 펩타이드를 썩덩나무노린재의 CAPA, Pyrokinin수용체에 대한 세포활성을 검정한 결과 CAPA펩타이드인 CAPA-PVK2는 CAPA 수용체(CAPA-R), Pyrokinin펩타이드 중 trpPK-1, PK2-1, PK2-L, PK2-2, PK2-2S가 Pyrokinin수용체(PK-R)에서 활성반응이 나타나는 것을 확인하였다.
- 나. 꽃노랑총채벌레 더듬이 전사체 분석 결과 암컷과 수컷간의 발현정도에서 차이나는 유전자 서열 총1,949개를 확보하였으며 수컷에서 발현이 증가된 유전자는 742개, 수컷에서 발현이 감소된 유전자수는 1,207개로 암컷의 더듬이에서 발현된 유전자가 많았다.
- 다. SPME를 이용하여 꽃노랑총채벌레 페로몬물질을 GC/MS에 분석한 결과 페로몬 물질은 수컷에서만 나타났고, 페로몬을 구성하는 각 물질에 대한 연령별 검출 정도와 한국과 미국집단에 대한 페로몬 구성물질의 비율차이를 구명하였다.
- 라. 꽃노랑총채벌레 페로몬 구성물질 중 A물질 단독처리 행동반응 분석결과 1 µg에서 암컷에 유인효과를 보였으며 수컷에는 10 µg에서 기피효과를 보였다. B물질 단독처리 행동반응 분석결과 1 µg에서 수컷에 기피효과를 보였으며 암컷에는 영향을 보이지 않았다.
- 마. 꽃노랑총채벌레의 페로몬 구성물질을 5개의 조합을 조성하여 루어 제작 후 유인 효과 시험결과 무처리(#1)를 제외한 모든 조합에서 유인효과를 보였다.
- 바. 합성펩타이드의 체내 검정을 위하여 해부현미경, 나노인젝터, 배큘스테인지를 활용하여 꽃노랑총채벌레 가슴에 주입하는 방법의 미세주입법을 구축하고 1 %의 설탕물에 합성펩타이드를 녹인 후 1.5 ml 튜브에 1 µl 처리 후 꽃노랑총채벌레를 접종하는 섭식검정법을 정립하였다.
- 사. 2종의 합성펩타이드는 세포수준에서 길항제(Antagonist) 및 작용제(Agonist)의 효과를 보였으나 체내에 주입하였을 때는 영향이 나타나지 않아 합성펩타이드의 설계, 추가적인 세포수준 및 체내수준의 검정을 통한 선발이 필요함을 시사하였다.

5. 인용문헌

- 윤승환, 한상욱, 이진구, 임갑준, 장재은, 한정아, 최종인, 장은규, 김상우, 이영순, 홍순성. 2022. 페로몬 생합성기작 구명 및 방제기술 개발. 2022년 경기도농업기술원 시험연구보고서. 611-630
- Ahn, S.J., Corcoran, J.A., Vander Meer, R.K., Choi, M.Y. 2020. Identification and characterisation of GPCRs for pyrokinin and CAPA peptides in the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Frontiers in Physiology*, 11, 559.
- Caers, J., Verlinden, H., Zels, S., Vandersmissen, H.P., Vuerinckx, K., Schoofs, L. 2012. More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: An overview. *Front. Endocrinol.* 3, 151.
- Choi, M.Y. 2022. Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) in insects. *Korean J. of Appl. Entomol.* 61(1), 15-28.
- Choi, M.Y., and Vander Meer. R.K. 2021. GPCR-Base bioactive peptide screening using phage-displayed peptides and insect cell system for insecticide discovery. *biomolecules*, 11(4), 583; <https://doi.org/10.3390/biom11040583>
- Demirozer, O., Tyler-Julian, K., Funderburk, J., Leppla, N., and Reitz, S. 2012. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) integrated pest management programs for fruiting vegetables in Florida. *Pest Manag Sci.* 68: 1537-1545.
- Huh, H.S., Yun, J.E., Takashi, W., Mizutani, N., Park, C.G. 2008. Composition of the aggregation pheromone components of korean bean bug and attractiveness of different blends. *Korean J. Appl. Entomol.* 42(2), 141-147.
- Ishiwata, K., Sasaki, G., Ogawa, J., Miyata, T., Su, Z.H. 2011. Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58, 169-180.
- Jurenka, R. 2015. The PRXamide neuropeptide signalling system: Conserved in animals. *Adv. Insect Physiol.* 49, 123-170.
- Karlson, P., Luscher, M. 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature.* 183, 55-66.
- Klun, J.A. and Cooperators. 1975. Insect sex pheromone: intraspecific pheromonal variability of *Ostrinia nubilais* on North America and Europe. *Environ. Entomol.* 4, 891-894.
- Löfstedt, C. 1990. Population variation and genetic control of pheromone communication systems in moths. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 233 ~ 238.
- Morse, J.G., and Hoddle, M.S. 2006. Invasion biology of thrips. *Annu Rev Entomol.* 51, 67-89.

- Mouden, S., Sarmiento, K.F., Klinkhamer, P.G., and Leiss, K.A. 2017. Integrated pest management in western flower thrips: past, present and future. *Pest Manag Sci.* 73, 813-822.
- Murmu, M.S., Hanoune, J., Choi, A., Bureau, V., Renou, M., Dacher, M., Deisig, N. 2020. Modulatory effects of pheromone on olfactory learning and memory in moths. *J. Insect Physiol.* 127, 104159.
- Nassel, D.R. and Zandawala, M. 2019. Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. *Prog. Neurobiol.* 179, 101607.
- Paluzzi, J.P. 2012. Anti-diuretic factors in insects: the role of CAPA peptides. *General and Comparative Endocrinology.* 176, 300-308.
- Park, K.C. 2022. Perception of sex pheromone moth. *Korean J. Appl. Entomol.* 61(1), 1-14.
- Rotenberg, D., Baumann, A.A., Ben-Mahmoud, S., Christiaens, O., Dermauw, W., Ioannidis, P., and Richards, S. 2020. Genome-enabled insights into the biology of thrips as crop pests. *BMC Biol.* 18, 142.
- Shi, Y., Nachman, R. J., Gui, S.H., Piot, N., Kaczmarek, K., Zabrocki, J., Dow, J.A.T., Davies, S.A., Smagghe, G. 2021. Efficacy and biosafety assessment of neuropeptide CAPA analogues the peach-potato aphid(*Myzus persicae*). *Insect Science.* vol29(2), 521 ~ 530.
- Van Hiel, M.B., Van Loy, T., Poels, J., Vandersmissen, H.P., Verlinden, H., Badisco, L. et al. (2010) Neuropeptide receptors as possible targets for development of insect pest control agents. In: Geary, T.G. & Maule, A.G. (Eds.) *Neuropeptide systems as targets for parasite and Pest control*, Vol. 692. New York: Springer, pp. 211-226.
- Yang, C.Y. 2022. Current status and future directions of pheromone research on orchard pest in korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 61(1), 51-62
- Yeoh, J.G.C., Pandit, A.A., Zandawala, M., Nassel, D.R., Davies, S.A., Dow, J.A.T. 2017. DIneR: Database for insect neuropeptide research. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 86, 9-19.

6. 연구결과 활용제목

- A sustainable mass rearing method for western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae) (' 22 논문게재, Florida Entomologist, SCD)
- Nano-injection method for micro-insects without sedation using the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (' 22 논문게재, Journal of Applied

Entomology, SCI)

- Nano-injection technique for western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (' 22 학술발표, 한국응용곤충학회)
- Identification and characterisation of PRXamide peptides in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (' 23 논문게재, Insect Molecular Biology, SCI)
- Identification and Characterization of CAPA peptides and CAPA Receptor in the Western Flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (' 24 학술발표, 한국응용곤충학회)
- Identification of agonist and antagonist using in vitro and in vivo bioassay for the western flower thrips(' 24 학술발표, Entomological Society of America)
- Identification of bioactive peptides using a GPCR system for Western flower thrips(' 24 학술발표, Entomological Society of America)

7. 연구원 편성

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
						22	23	24
페로몬	책임자	환경농업연구과	농업연구사	윤 승 환	세부과제 총괄	○	○	○
생합성기작 구명 및 생리응용 방제기술 개발	공동연구자	환경농업연구과	농업연구관	한 상 욱	자 료 조 사	○	-	-
	〃	〃	〃	심 상 연	〃	-	○	-
	〃	작물연구과	〃	임 성 희	〃	-	-	○
	〃	행정지원과	농업연구사	최 중 인	특 성 조 사	○	○	-
	〃	환경농업연구과	〃	한 정 아	〃	○	○	○
	〃	〃	〃	조 동 현	〃	○	○	○
	〃	종자관리소	〃	최 준 영	〃	-	-	○
		환경농업연구과	농업연구관	박 중 수	연 구 자 문	○	○	○