

Research Article



CrossMark

Open Access

## 온도 차이에 따른 배추좀나방 유충 지방체에서 발현되는 G 단백질 연관 수용체의 동정

김광호<sup>1</sup>, 이대원<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과, <sup>2</sup>경성대학교 생명보건대학 바이오안전학과

### Identification of G Protein Coupled Receptors Expressed in Fat Body of *Plutella Xylostella* in Different Temperature Conditions

Kwang Ho Kim<sup>1</sup> and Dae-Weon Lee<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup>Crop Protection Division, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea, <sup>2</sup>Department of Biosafety, Kyungsung University, Busan 48434, Korea)

Received: 2 January 2021/ Revised: 6 January 2021/ Accepted: 18 January 2021

Copyright © 2021 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Kwang Ho Kim

<https://orcid.org/0000-0001-9780-3296>

Dae-Weon Lee

<https://orcid.org/0000-0001-9780-3296>

### Abstract

**BACKGROUND:** G protein-coupled receptors (GPCRs) are widely distributed in various organisms. Insect GPCRs shown as in vertebrate GPCRs are membrane receptors that coordinate or involve in various physiological processes such as learning/memory, development, locomotion, circadian rhythm, reproduction, etc. This study aimed to identify GPCRs expressed in fat body and compare the expression pattern of GPCRs in different temperature conditions.

**METHODS AND RESULTS:** To identify GPCRs genes and compare their expression in different temperature conditions, total RNAs of fat body in *Plutella xylostella* larva were extracted and the transcriptomes have been analyzed via next generation sequencing method. From the fat body transcriptomes, genes that belong to GPCR Family A, B, and F were identified such as opsin, gonadotropin-releasing hormone receptor, neuropeptide F (NPF) receptor, muthuselah (Mth), diuretic hormone receptor, frizzled, etc. Under low temperature, expressions of GPCRs such as C-C chemokine receptor (CCR), opsin, prolactin-releasing

peptide receptor, substance K receptor, Mth-like receptor, diuretic hormone receptor, frizzled and stan were higher than those at 25°C. They are involved in immunity, feeding, movement, odorant recognition, diuresis, and development. In contrast to the control (25°C), at high temperature GPCRs including CCR, gonadotropin-releasing hormone receptor, moody, NPF receptor, neuropeptide B1 receptor, frizzled and stan revealed higher expression whose biological functions are related to immunity, blood-brain barrier formation, feeding, learning, and reproduction.

**CONCLUSION:** Transcriptome of fat body can provide understanding the pools of GPCRs. Identifications of fat body GPCRs may contribute to develop new targets for the control of insect pests.

**Key words:** Control Target, G Protein Coupled Receptor, *Plutella Xylostella*, Temperature, Transcriptome

### 서론

곤충에서 초파리의 유전체가 처음으로 보고된 이래[1], 농업과 위생, 환경 분야에 관련된 곤충에서 다양한 신경호르몬과 그들의 수용체에 대한 기능들이 보고되어 왔다[2-4]. 신호 분자인 호르몬들은 표적세포의 세포막에 존재하는 특정 수용

\*Corresponding author: Dae-Weon Lee  
Phone: +82-51-663-4644; Fax: +82-51-627-4645;  
E-mail: daeweonlee@ks.ac.kr

체 분자들을 통해 작용하고[5], 대부분 수용체들은 G 단백질 연관 수용체(G protein coupled receptor, GPCR)에 속한다[6]. GPCR은 구조적으로 7개의 transmembrane을 가지며, 다양한 곤충에서 특성이 보고되었다[7-9]. 호르몬을 포함한 리간드가 수용체에 결합하면, 3차 구조 변화를 일으키고, GPCR effector의 활성화를 유도한다. 주된 세포내 GPCR effector는 서로 다른 삼량체(heterotrimeric)인 G 단백질로,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  단위체로 구성되어 있다. G 단백질의 활성형은 GTP와 결합되어 있으나, 비활성형은 GDP와 결합된 형태이다. GPCR에 의해 활성을 띠는  $G_{\alpha}$  단위체( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i/o}$ ,  $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha 12/13}$ )의 종류에 따라 신호전달 경로의 2차 매개자(cAMP 또는  $Ca^{2+}$ )도 달라진다. 신호전달경로에서 2차 매개자들에 의한 신호 증폭의 결과로 다양한 생리적 반응이 일어난다. 곤충에서 biogenic amine, 신경펩타이드,  $\gamma$ -Aminobutyric acid 등과 같은 리간드가 GPCR의 활성을 유도한다. 곤충에서 GPCR을 통한 신호전달은 신경내 신호전달 및 조절, 내분비 기능, 일일주기, 시각자극수용, 탈피, 섭식조절, 페로몬 생합성, 생식, 학습과 기억, 다양한 대사작용[6, 10, 11] 등의 생리적 과정과 연관되어 있다.

곤충의 GPCR 분류는 대개 약리적 기능에 따라 결정되며, 인간의 GPCR 분류체계를 기반으로 분류하면, A family는 rhodopsin-like 수용체로 주로 biogenic amine 수용체, 페로몬 생합성 촉진 신경펩타이드 수용체, tachykinin 수용체 등이 속하며, B family는 크게 secretin(B1), adhesion(B2)으로 나뉘며, mthuseelah, latrophilin-like 수용체가 있다. C family는 N-methyl-D-aspartate 수용체와 glutamate 수용체가 있으며, D family는 균류의 mating pheromone 수용체, E family는 cAMP 수용체이며, 비전형적 구조를 가진 수용체들(Frizzled, stan, smoothened)은 F family에 속한다.

배추좀나방은 전세계적으로 분포하며, 배추, 양배추 등의 십자화과 작물에 심각한 피해를 주는 해충으로 알려져 있다[12, 13]. 이들의 분포는 기후식물의 분포와 관련이 있지만, 물리적 요소인 온도와도 밀접하다. 온도는 곤충의 생존 및 분포에 영향을 미치는 물리적 요인으로, 고온에 지속적으로 노출되면 발육 및 생식 등에 영향을 주며, 빙결온도 이하의 저온에서는 생존하기가 어렵다. 배추좀나방은 화학약제에 대한 높은 저항성으로 인한 경제적 피해수준이 높기 때문에 농업 분야에서 중요하다[14]. 따라서 저항성 해충에 대해 활성을 가지는 새로운 약제 개발에 대한 요구가 증대되고 있으며, 이들 약제들은 환경적으로나 독성학적으로 엄격한 규제를 충족시켜야 한다. 기존의 저항성을 유발하는 약제를 대체하기 위한 새로운 방제표적은 약제저항성을 극복을 위한 대안으로 활용될 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다[15]. GPCR은 새로운 살충표적 개발을 위한 잠재적 표적들 중 하나로 인식되고 있다[16]. 본 연구는 다른 온도조건 아래, 배추좀나방의 생리적 대사중심인 지방체에서 GPCR 발현 차이를 확인하기 위해, 전사체 분석을 통해서 GPCR을 동정하고, 차등발현 유전자 발현양을 추정하였다. 전사체 분석을 통해 Family A,

B, F에 속하는 다양한 GPCR이 지방체에서 발현되었다. 이것은 지방체가 물질대사의 주된 기능에만 국한되지 않고, 생리적으로 중요한 기능을 하는 유전자들을 발현시킴으로써, 새로운 방제제의 표적으로 활용될 수 있는 가능성을 보여준다.

## 재료 및 방법

### 배추좀나방 사육

배추좀나방의 유충은 아크릴 사육상(60 × 60 × 60 cm)에 배추잎을 공급하여 사육하였다. 성충의 사육은 아크릴 사육상에서 먹이로 10% 설탕물을 공급하였고, 산란을 위해 배추잎을 매일 공급하였다. 사육조건에서 습도는 60 ± 10%을 유지하였고, 대조구는 항온 25°C, 시험구는 35°C 항온조건과 저온(3-10°C)에서 각각 사육하였고, 광주선 16:8(L:D) h이었다.

### Total RNA 추출과 전사체 확보

저온조건(3~10°C), 고온조건(35°C)과 항온조건(25°C)에서 사육한 배추좀나방 4령 유충이 되었을 때, 해부용 가위를 이용하여 지방체를 분리하였다. 분리한 지방체로부터 total RNA를 분리하기 위해, RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, USA)를 사용하였다. 추출한 total RNA 시료에서 DNA를 제거하기 위해 DNase를 처리하였다. mRNA를 분리하기 위해, poly-A tail을 갖는 특성을 이용하여 poly-T magnetic bead를 사용하였다. 또한 non-coding RNA를 제거하기 위해, Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit(Illumina, USA)을 사용하였다. Short read sequencing을 위한 정제된 mRNA 절편화를 수행하였고, cDNA 합성을 위한 역전사 과정을 수행하였다. cDNA 절편의 양끝에 adaptor를 붙이고, PCR을 수행하였다. 약 200-400 bp 크기의 증폭 크기를 가진 DNA를 선택하고, pair-end sequencing을 통해 절편 서열을 분석하였다.

### 전사체 분석

확보된 1차 서열 분석 결과(sequenced raw data)에 대한 quality control을 수행하였다. 대략적인 read quality, 전체 염기의 수, 절편수의 GC (%) 등을 산출하였다. Trimmomatic (Ver. 0.32; [17])를 사용하여, low quality read, adaptor 서열, DNA 오염 등의 분석 결과에 영향을 미칠 수 있는 요소들을 제거하였다. 모든 시료에서 교정된 read들은 전사체를 구축하는데 사용되었으며, Trinity 프로그램을 이용하여 합쳐진 결과들을 구축하였다[18]. 전사체에 대한 *de novo* reconstruction을 수행하여 유전자 염기서열인 contig를 확보하였다. 확보된 유전자들에 대해 가장 긴 길이를 가지는 contig를 분석하여, 중복되지 않는 unigene을 구성하였다. 확보된 unigene을 통해 유전자의 annotation, 염기 및 아미노산 서열을 추정하였다. 추정된 아미노산서열을 이용하여 GPCR의 특징인 7개의 transmembrane domain 포함여부를 TMPred([https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_](https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_)

form.html)를 이용하여 확인하였다. 유전자의 annotation은 BlastX(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하였다. Unigene 유전자의 발현빈도는 전사체 기반 차등발현 유전자 발현양(Fragments Per Kilobase of transcript per Million, FPKM)으로 분석하였고, 발현의 수준은 read count로 산출하였다. 본 연구에 사용된 전사체 정보는 NABIC(<http://nabic.rda.go.kr>)에 등록하였다(NN-1865-000001, NN1863-000001, NN-1864-000001).

### GPCRs의 계통수 분석

배추좀나방 지방체 전사로부터 얻은 아미노산 서열을 ClustalW (MegAlign ver. 7.1.0.)로 정렬하였다. 정렬된 아미노산 서열에 대한 계통분류는 neighbor-joining 방법을 통해 분석되었고, Molecular Evolutionary Genetic Analysis (Ver. 7.0) 프로그램으로 작성되었다.

## 결과 및 고찰

이전의 보고[19]에서 배추좀나방 지방체의 전사체로부터 125,154개의 contig를 만들었다. 이들 중에서 30개의 G 단백질 연관 수용체(GPCR)를 동정하였다(Table 1). 동정된 GPCR에 대해 구조의 유사성에 따라 3개 그룹으로 분류하였다: family A(16개 수용체), family B(11개 수용체), family F(3개 수용체)(Table 1). 동정된 GPCR을 다른 곤충의 GPCR의 서열 유사성을 기준으로 정렬하였고, 유전자들 간의 계통 분석을 수행하였다(Fig. 1, 2, 3).

### 5-hydroxytryptamine (5HT) 수용체

곤충동물의 biogenic amine 수용체는 작은 분자 조절제의 잠재적 표적이다[20]. Biogenic amines은 방향족 측쇄를 가진 아미노산의 파생체로 절지동물에서 기억과 학습, 운동, 일일주기, 타액분비, 이뇨, 발달, 생식과 스트레스 반응과 같은 다양한 신경생리학적 과정에 관여한다[21-24]. 곤충의 biogenic amine 수용체는 dopamine, serotonin(5-hydroxytryptamine, 5-HT), octopamine/tyramine, muscarinic acetylcholine 수용체 등이 있다. 배추좀나방의 지방체 전사체에서는 2개의 5-HT 수용체 contig (c36149\_g1\_i1와 c28836\_g1\_i1)가 확인되었다. c36149\_g1\_i1은 대조구에 비해서 저온과 고온 모두 발현양이 낮았다. c28836\_g1\_i1은 5-HT1A에 속하는 수용체로 분류되었고, 전사체 기반 차등발현 유전자 발현양은 저온 온도에서는 대조구와 발현양의 차이가 나타나지 않았으나, 고온에서 발현양은 감소되었다(Table 1). 계통분류에서 2개 contig들은 서로 다른 분지도를 형성하였고, 각각 rhodopsin과 opsin 수용체와 같은 분지를 형성하였다(Fig. 1). 5-HT는 심장 수축조절, 발생, 일일주기, 공격적 행동, 이동, 화학물질 감각기반 학습과 기억에 관여하는 것으로 알려져 있다[25, 26]. 초파리에서 5-HT의 5개 수용체 subtype(5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT7)에 대한 약리적 반응이 보고되었[25]. 5-HT 처리를 통해 5-HT1 수용체는 세포 내 2차 전

령인 cAMP 농도를 낮추는 것으로 알려져 있다[27].

### C-C Chemokine 수용체 (CCR)

CCR type 7은 인간에서 CCR7 유전자에 의해 만들어지며, 주로 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 2개의 ligand (chemokine ligand 19, 21)가 동정되었다[28]. Chemokines은 염증반응에 중요한 분자로 면역반응조절자로 역할하며, 림프구 형성에도 중요하며[29], CCR7 과 ligands는 면역관련 류머티즘 관절염의 자가면역 모델의 필수적인 구성요소로 알려져 있다[30]. CCR 유전자는 1개의 contig(c48220g1\_i1)가 확인되었으며, 유전자의 발현양은 대조구에 비해서 저온과 고온에서 모두 발현양이 높았다. 특히 고온에서 발현양의 차이는 10배에 가까웠다(Table 1). 계통분류에서 CCR은 5-HT 수용체와 같은 분지를 형성하였다(Fig. 1). 곤충에서 CCR은 구조적 유사한 서열들이 밝혀졌으나 이들의 생리적 생화학적 기능에 대한 연구가 필요하다.

### gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 수용체

Adipokinetic hormone(AKH), corazonin(CRZ), AKH/CRZ-related peptide(ACP)와 같이 구조적으로 GnRH와 유사한 다양한 신경펩타이드가 다양한 무척추 동물들에서 보고되고 있다[31]. 곤충에서 보고된 AKH, CRZ, ACP의 구조적 유사성을 비교하면, N-말단에서 pyro-Glu 잔기, C-말단에서 amide기, 세 번째 아미노산이 보존적인 Phe, 또는 Tyr 잔기가 위치하고 있다. GnRH, AKH, CRZ, ACP는 구조적 유사성을 보이내[32], 각각의 호르몬들은 독특한 생리적 특성을 보인다[33]. 이들 수용체는 GPCR로 무척추 동물에 광범위하게 분포한다[31, 32]. *Ae. aegypti* AKH 수용체와 CRZ 수용체는 척추동물의 GnRH에 상응하며, 모기에서 생식에 관여하며[34], 다른 곤충의 AKRH와 ligand 특이성에서 차이를 보인다[35]. GnRH 수용체는 1개의 contig(c43218\_g1\_i1)가 확인되었으며, 유전자의 발현양은 대조구에 비해서 저온에서 약간 많았으나, 고온에서는 발현양이 현저히 낮았다(Table 1). 계통분류에서 GnRH 수용체는 rhodopsin과 같은 분지를 형성하였다(Fig. 1).

### GPCR moody

초파리에서 GPCR moody 유전자(CG4322)는 2개의 splicing 변이체(Moody- $\alpha$ , Moody- $\beta$ )를 만들며 이들은 구조적으로 C-말단에만 차이가 있다. 이들 수용체는 신경계를 둘러싸고 절연체 기능을 하는 glial 세포에서 발현된다. Glial 세포는 초파리의 혈액 뇌 장벽의 형성과 유지에 필수적이다[36]. GPCR moody는  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha o}$ ,  $G_{\beta 13\beta}$ ,  $G_{\gamma 1}$ 을 순차적으로 활성화시켜 glia 표면에서 actin 축적을 변화시켜, septate junction 단백질들을 조직화하는데 영향을 준다[7]. GPCR moody는 2개의 contig(c52289\_g1\_i1, c52289\_g1\_i4) 확인되었으며, 유전자의 발현양은 대조구에 비해 저온에서 약간 높았으나, 고온에서는 발현양이 현저히 낮았다(Table 1). 계통분류에서 GPCR moody는 독립적인 분지를 형성하였다(Fig. 1).

Table 1. Identification of G protein-coupled receptors (GPCRs) in fat body of *Plutella xylostella*

Type	contig	Annotation	Accession #	FPKM*			Species	Identity (%)	E-value
				Low (3-10°C)	Control (25°C)	High (35°C)			
A	c36149_g1_i1	5-hydroxytryptamine receptor	XP_021189580.1	0.77	2.14	0.56	<i>Helicoverpa armigera</i>	97	1.00E-86
A	c28836_g1_i1	5-hydroxytryptamine receptor 1A-alpha	XP_026755055.1	4.18	7.48	7.77	<i>Galleria mellonella</i>	78	3.00E-30
A	c48220_g1_i1	C-C chemokine receptor type 7-like	XP_026320255.1	37.40	3.87	12.89	<i>Hyposmocoma kahamanao</i>	46	7.00E-82
A	c43218_g1_i1	gonadotropin-releasing hormone receptor	XP_011566139.1	1.41	18.81	27.01	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c52289_g1_i2	G-protein coupled receptor moody X2	XP_011558182.1	0.51	1.87	2.77	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c52289_g1_i4	G-protein coupled receptor moody X2	XP_011558182.1	0.77	2.16	2.63	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c42962_g1_i1	neuropeptide F receptor	XP_011565078.1	0.90	0.65	3.52	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c54142_g2_i2	opsin-3	NP_001292410.1	5.54	4.02	0.36	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c54142_g2_i3	opsin-3	NP_001292410.1	5.23	4.19	0.58	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c54142_g2_i1	opsin-3	NP_001292410.1	7.39	4.12	0.57	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c45810_g1_i2	prolactin-releasing peptide receptor-like	XP_011565707.1	156.11	94.23	37.6	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c45810_g1_i1	prolactin-releasing peptide receptor-like	XP_011565707.1	163.17	97.02	40.17	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c49354_g1_i1	rhodopsin, GQ-coupled-like isoform X1	XP_011552091.1	0.02	1.19	0.63	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
A	c47082_g1_i4	sex peptide receptor-like	XP_013195850.1	6.72	20.53	9.21	<i>Amyelois transitella</i>	100	0
A	c50243_g1_i1	substance-K receptor-like	XP_011552653.1	21.4	8.81	2.90	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c97944_g1_i1	G-protein coupled receptor Mth-like 1	XP_028028989.1	24.06	1.38	1.14	<i>Bombyx mandarina</i>	85	3.00E-110
B	c55174_g1_i1	adhesion G-protein coupled receptor G2-like	XP_030023487.1	34.27	11.87	9.13	<i>Manduca sexta</i>	100	0
B	c47085_g1_i6	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011550482.1	11.20	1.92	1.05	<i>Plutella xylostella</i>	94	2.00E-71
B	c47085_g1_i1	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011556482.1	14.03	2.71	1.98	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c47085_g1_i5	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011556482.1	5.96	0.93	1.02	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c47085_g1_i7	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011556482.1	5.28	1.34	0.82	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c47085_g1_i2	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011556482.1	14.57	3.06	1.67	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c47085_g1_i3	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011556482.1	23.86	4.11	2.99	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c47085_g1_i4	G-protein coupled receptor Mth-like	XP_011556482.1	8.19	2.37	1.53	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c49241_g1_i1	G-protein coupled receptor Mth-like 3	XP_011556483.1	16.12	34.25	29.14	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c49260_g1_i1	diuretic hormone receptor isoform X2	XP_011559921.1	70.41	45.85	14.4	<i>Plutella xylostella</i>	100	0
B	c29403_g1_i1	neuropeptide receptor B1	ALM88341.1	0.39	0.86	5.61	<i>Chilo suppressalis</i>	91	2.00E-56
F	c38254_g1_i1	frizzled-4	XP_026756210.2	2.24	0.25	0.78	<i>Galleria mellonella</i>	93	6.00E-69
F	c35480_g1_i1	atypical G-protein coupled receptor GPRfz3	KOB78361.1	4.78	1.04	1.52	<i>Operophtera brumata</i>	87	4.00E-83
F	c48464_g1_i1	protocadherin-like wing polarity protein stan	XP_011556926.1	1.59	0.05	0.19	<i>Plutella xylostella</i>	100	0

\* FPKM means fragments per kilobase of transcript per million

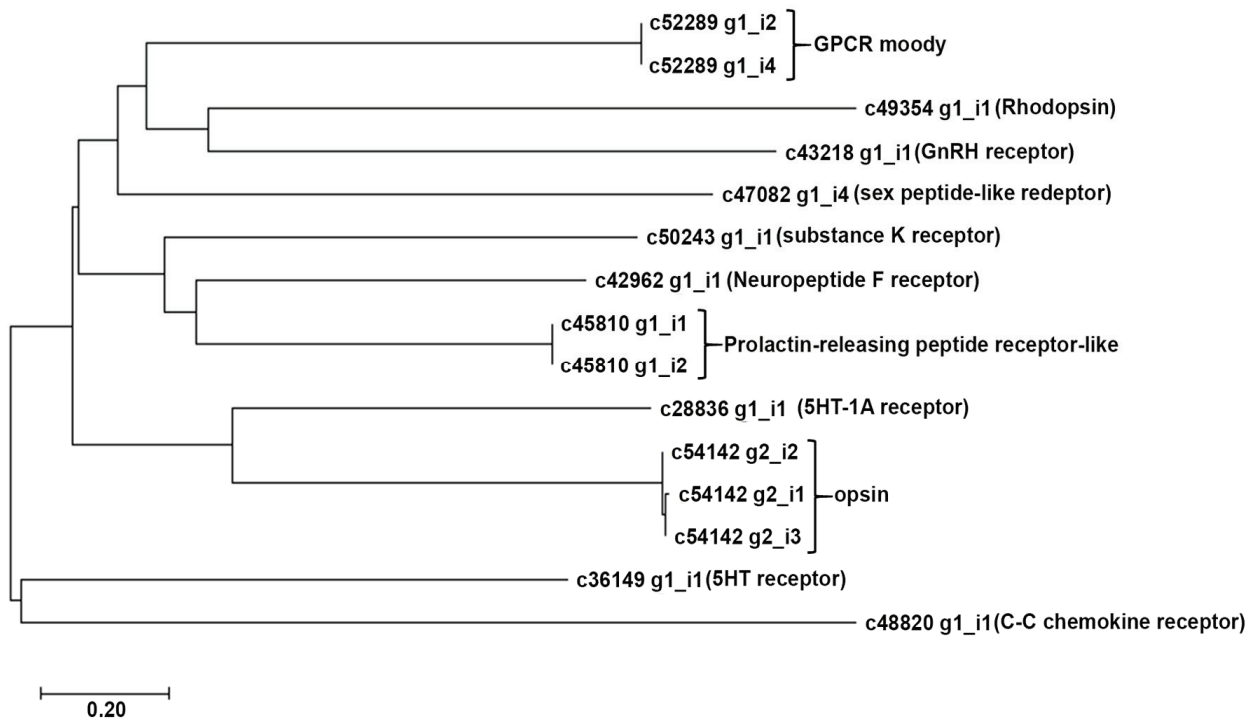


Fig. 1. The phylogenetic analysis of GPCR family A identified from fat body of *Plutella xylostella*. The number below the bar indicates phylogenetic distance value.

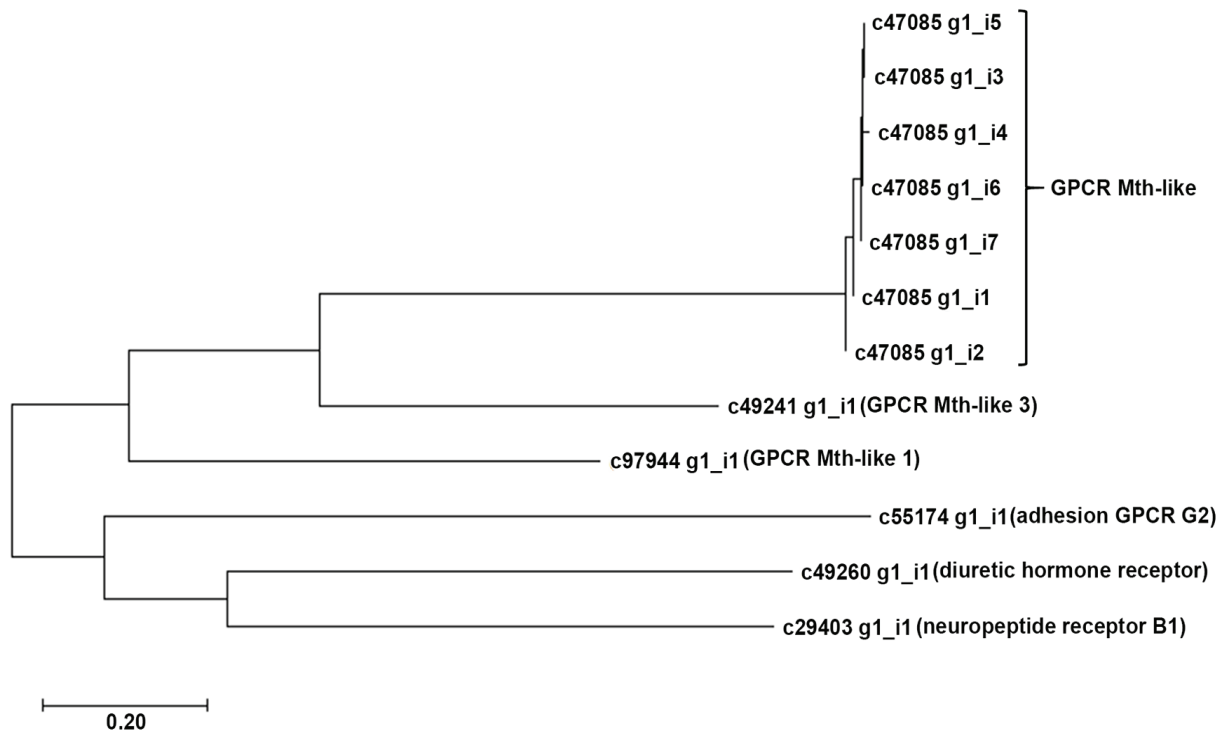


Fig. 2. The phylogenetic analysis of GPCR family B identified from fat body of *Plutella xylostella*. The number below the bar indicates phylogenetic distance value.

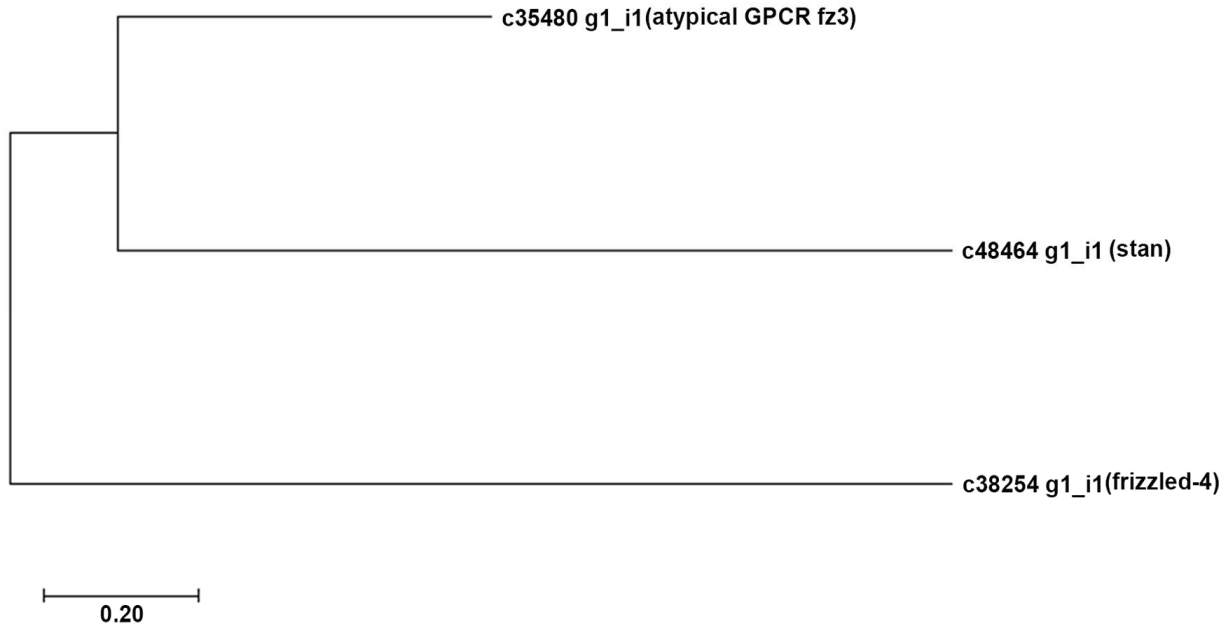


Fig. 3. The phylogenetic analysis of GPCR family F identified from fat body of *Plutella xylostella*. The number below the bar indicates phylogenetic distance value.

### Neuropeptide F (NPF) 수용체

무척추동물의 NPF는 구조적으로 척추동물의 neuropeptide Y(NPY) family와 유사하다. 초파리의 NPF는 곤충에서 발견된 최초의 NPY/NPF family이다[37]. 곤충의 NPF는 보존적 공통서열로  $X_nPxRx_nYLx_2Lx_2YYx_4RPRFamide$ 를 가진다[38]. 초파리의 NPF는 다양한 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 섭식, 알콜민감성, 스트레스, 생식, 학습, 운동 [39-42]. 다른 곤충들에서 NPF는 섭식행동에 관여하는 것으로 알려져 있다[43, 44]. 초파리에서 NPF 수용체는 증장세포, 많은 뇌신경, 유충에서는 배면신경절, 성충에서는 뇌에서도 발견된다[40]. *Anopheles* NPF 수용체는 알을 제외한 모든 발달단계에서 발견된다. NPF는 또한 circadian activity에도 관여하는 것으로 알려져 있다[45]. 초파리 NPF 수용체는 radioreceptor 연구법을 통해 특성이 밝혀졌다. 신호전달 경로는 Gi와 adenylate cyclase를 통해 forskolin이 자극하는 cAMP 생산을 저해한다. 배추좀나방 지방체 전사체에서 NPF 수용체는 1개 contig(c42962 g1\_i1)가 동정되었고, 대조구에 비해 저온에서 발현양이 현저히 높았으나 고온에서는 발현양의 차이를 보이지 않았다(Table 1). 계통분류에서 NPF 수용체는 prolactin 분비 펩타이드 수용체와 가까운 분지를 형성하였다(Fig. 1). NPF 수용체는 *Anopheles*에서도 특성이 구명되었고[46], 누에나방이나 *Tribolium*과 같은 여러 곤충에 있을 것으로 추정되었다[47-49].

### Opsin

Opsin은 광색소로 알려져 있으며, 광수용체의 스펙트럼 민감도를 결정한다. 대개 opsin은 흡수하는 파장의 길이에

따라서 크게 2 그룹으로 분류한다: 1) 긴 파장을 흡수하는 무척추동물 시각 색소, 2) 짧은 파장을 흡수하는 무척추동물의 시각색소[50, 51]. 전사체로부터 3개의 긴 파장에 반응하는 opsin contig(c54142\_g2\_i1, i2, i3)를 동정하였다. 이들의 차등발현 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서 현저히 낮았으며 고온에서는 약간 높은 것으로 나타났다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 opsin은 5-HT1A 수용체와 가까운 분지를 형성하였다(Fig. 1). Opsin은 나비목 곤충에서 교미 결정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[52]. 파밤나방에서 교미 후, opsin의 발현은 암수 모두에서 감소하고, 짧은 파장을 흡수하는 opsin에 대한 유전자 발현 역제는 성충의 녹색광에 대한 주광성을 감소시킴으로써 opsin이 나방의 주광성에 관련이 있음이 보고되었다[51].

### Prolactin-releasing peptide 수용체 (Prp)

Prp 수용체는 짧은 신경펩타이드 F 수용체(short neuropeptide F receptor; sNPF)로 새롭게 제안되었다[53]. sNPF 신호전달 경로는 곤충에서 섭식, 이동, 일일주기, 생식 등과 같은 다양한 생리적인 과정에 관여한다. sNPF는 예외적으로 절지동물과 일부 곤충들에서 발견되었다[54, 55]. 대부분 곤충에서 sNPF 유전자는 다수의 sNPF isoforms을 가진다[56]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 Prp 수용체는 2개 contig (c45810 g1\_i1, c45810 g1\_i2)가 동정되었고, 전사체 기반 차등발현 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서 현저히 낮았으며, 고온에서는 약간 높은 것으로 나타났다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 Prp 수용체는 독립된 분지를 형성하며, NPF와 가까운 분지를 형성하였다(Fig. 1).

### Rhodopsin-like 수용체

Rhodopsin-like 수용체는 가장 큰 GPCR Family A subgroup을 형성한다. Rhodopsin-like 수용체는 발달, 생식, 행동, 섭식 등의 다양한 생리적 활동을 조절하며, 여러 곤충에서도 보고가 되어 있다[10, 49, 57]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 Rhodopsin-like 수용체는 1개 contig(c49354 g1\_i1)가 동정되었고, 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서 절반수준으로 낮았으며, 고온에서는 발현양이 현저히 감소하였다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 Rhodopsin-like 수용체는 GnRH 수용체와 NPF와 가까운 분지를 형성하였다(Fig. 1).

### sex peptide 수용체

초파리에서, 수컷의 부속샘에서 생성되는 sex peptide는 교미과정동안 암컷으로 전달된다. sex peptide는 초파리 암컷에서 일어나는 교미 후 영향을 유도한다[58]. 전달된 Sex peptide는 암컷의 페로몬 샘과 뇌에 있는 수용체에 결합하여, 산란과 교미억제를 유도하고[59], 암컷의 수면패턴을 변화시키고[60], 항균 펩타이드(anti-microbial peptide) 발현을 증가시킨다[61]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 sex peptide 수용체는 1개 contig(c47082 g1\_i1)가 동정되었고, 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온과 고온에서 모두 낮게 나타났다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 sex peptide 수용체는 독립된 분지를 형성하였다(Fig. 1).

### Substance K 수용체

Substance K 수용체는 구조적 유사성으로 rhodopsin-like 수용체에 속하며, neurokinin 으로 불리기도 한다[62]. 소의 substance K 탐침을 이용하여 초파리에서 처음으로 유전자가 클로닝되었고 tachykinin-like peptide 수용체로 보고되었다[63]. 곤충의 Tachykinin 관련 펩타이드는 냄새감각, 이동, 공격행동, 지질대사, 근육활성 등의 다양한 생리적 과정에 관여하며, 수용체 활성화를 통해 작용한다[64]. 이들 수용체는 세포 내부의 칼슘의 농도를 증가시켜 신호전달 경로를 유지한다[65, 66]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 Substance K 수용체는 1개 contig(c50243 g1\_i1)가 동정되었고, 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서 대조구에 비해 현저히 낮았으나 고온에서는 발현양이 2.5배정도로 증가하였다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 Substance K 수용체는 독립된 분지를 형성하였다(Fig. 1).

### Mth (Mth) 수용체

Mth 수용체는 GPCR B family에 속하며, 초파리에서는 15개의 Mth 수용체 유전자가 보고되었다. 이들 유전자의 대부분에서 세포외부 도메인에서 10개의 시스테인 잔기와 일부 당화 위치가 밝혀졌다[67, 68]. Mth는 초파리에서 스트레스를 견디는 유전자로 보고되었고, 산화적 스트레스 저항성과 생존력에 영향을 준다[69]. 초파리 유전자인 stunted가 만드는 2개의 미토콘드리아 ATP synthase  $\epsilon$  소단위체가 Mth

수용체를 활성화시킨다[70]. 일부 나비목 곤충에서 Mth 유전자가 밝혀졌으나, 초파리의 경우와 달리 Mth 유전자의 생물학적 기능은 연구가 필요하다[49, 57, 71], 각 Mth 유전자는 종류에 따라 발육단계에서 발현의 차이가 있는 것으로 보고되었다[72, 73]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 Mth 수용체는 9개 contig(c97944 g1\_i1, c47085 g1\_i1, c47085 g1\_i2, c47085 g1\_i3, c47085 g1\_i4, c47085 g1\_i5, c47085 g1\_i6, c47085 g1\_i7, c49241 g1\_i1)가 동정되었고, 유전자 발현양은 대체로 대조구(25°C)에 비해 저온에서는 비슷하거나 낮았으나, 고온에서는 현저히 높은 발현양을 나타냈다(Table 1). 예외적으로 Mth-like 3 수용체는 저온과 고온 모두에서 발현양이 낮게 나타났다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 Mth 수용체는 독립된 분지를 형성하였으며, 종류에 따라 다른 위치로 분지되었다(Fig. 2).

### adhesion GPCR G2

사람에서 adhesion GPCR G2는 지방조직을 가지는 남성의 생식기관에서 대부분 발현된다[74]. 대벌레의 일종인 *Carausius morosus*에서 adhesion GPCR G2는 소화기관과 신경절에서 발현되었으나[75], 생물학적 기능에 대해서는 아직 연구보고가 없다. 배추좀나방 지방체 전사체에서 adhesion GPCR G2는 1개 contig(c55174 g1\_i1)가 동정되었고, 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서는 비슷하거나 낮았으나, 고온에서는 현저히 높은 발현양을 나타냈다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 adhesion GPCR G2는 독립된 분지를 형성하였다(Fig. 2).

### 이노호르몬 수용체와 신경펩타이드 B1 수용체

신경펩타이드 B1 수용체는 이노호르몬 수용체와 구조적으로 유사한 것으로 알려져 있다. 이들이 속하는 GPCR B family는 cAMP가 매개하는 신호전달 경로에 관여하는 것으로 알려져 있다. 곤충에서 물과 이온 사이의 균형은 생존에 필수적이다. 이노호르몬들의 생리적인 중요성이 보고되었다[76]. 이노호르몬은 크게 corticotropin 분비형과 calcitonin 형으로 분류한다. 바퀴벌레인 *Diploptera punctata*에서 calcitonin 형 호르몬이 처음으로 발견되어 Malpighian tubule에서 이노를 증가시킨다는 보고 이래로[77], 초파리와 *Rhodnius prolixus*에서도 수용체가 보고되었다[78, 79]. 곤충에서 이노호르몬은 수용체와 결합하여 cAMP 수준을 증가시켜 삼투압의 균형을 조절하고, *Spodoptera littoralis*에서는 이노호르몬이 유충의 발육을 억제한다[80, 81]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 이노호르몬 수용체와 신경펩타이드 B1 수용체는 각각 c49260 g1\_i1과 c29403 g1\_i1이 동정되었다. 이노호르몬 수용체 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서는 현저히 낮았으나, 고온에서는 발현양이 약간 높았다(Table 1). 신경펩타이드 B1 수용체의 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온에서는 현저히 높게 나타났으나, 고온에서는 오히려 낮게 나타났다(Table 1). 계통분석에서 배추좀나방의 이노호르몬 수용체와 신경펩타이드 B1 수용체는 서로 같은 분지를 형성

하였다(Fig. 2).

### Frizzled

Frizzled는 starry night, Bride of sevenless와 더불어 비전형적인 GPCR 에 속하며, 이들 간에는 어떠한 구조적 유사성이 없다. Frizzled 는 당단백질 리간드인 Wnt의 수용체로 알려져 있으며, Wnt 신호경로를 개시한다. 이를 통해, Frizzled는 초파리에서 세포 안의 Ca<sup>2+</sup> 이동 뿐만 아니라 발달을 조절한다[82, 83]. 배추좀나방 지방체 전사체에서 Frizzled 관련 유전자는 2개 contig(c38254 g1\_i1과 35480 g1\_i1)가 확인되었다. Frizzled 관련 유전자들의 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온과 고온에서 높게 나타났으며, 특히 고온에서 발현양은 현저히 증가하였다(Table 1). 계통분석에서 Frizzled 관련 유전자들은 독립적인 분지를 형성하였다(Fig. 3).

### protocadherin-like wing polarity 단백질(stan)

Flamingo라고도 불리는 Starry night(Stan)은 비전형적인 GPCR 로 많은 transmembrane 영역을 가지며, 일부 cadherin, EGF-like, laminin domain 등을 가진다[84]. Stan 유전자 발현양은 대조구(25°C)에 비해 저온과 고온에서 현저히 높게 나타났으며, 특히 고온에서 발현양은 30배 이상으로 증가하였다(Table 1). Stan은 frizzled 3와 같은 분지를 형성하였다(Fig. 3). 초파리에서, Stan은 planar cell polarity를 유도하는 것으로 알려져 있지만[85], 생물학적기능을 이해하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

이상의 결과는 온도에 따른 GPCR의 발현 패턴도 종류에 따라 차이가 있음을 보여주었다. 저온에서 발현이 높은 GPCR은 CCR, opsin, Prp 수용체, substance K 수용체, Mth-like 수용체, 이노호르몬 수용체, frizzled, stan으로 이들의 기능은 면역반응, 섭식 및 이동, 냄새감각 및 대사, 이노, 발달 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 고온에서 발현이 높은 GPCR은 CCR, GnRH 수용체, GPCR moody, NPF 수용체, 신경펩타이드 B1 수용체, frizzled, stan으로 이들은 주로 면역, 혈액-뇌장벽 형성, 섭식 및 학습, 생식 등에 관여하는 것으로 보인다. 고온에 노출되면 면역활동이 활발하며, 대사관련 효소 활성이 증가하여, 병원체에 대한 저항성 또한 높아지는 것으로 알려져 있다. 따라서 지방체에서 다양한 GPCR 발현은 지방체의 생리적기능이 대사과정에만 국한되지 않을 수 있음을 보여주며, 대사활동의 중심인 지방체에서 GPCR의 동정은 새로운 해충 방제의 표적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### Note

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgement

This work was carried out with the support of

“Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ012307)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

### References

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Roger AH et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JC et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591), 129-149. <https://doi.org/10.1126/science.1076181>.
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T, Kanamori H, Namiki N, Kitagawa M, Tamashita H et al. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11(1), 27-35. <https://doi.org/10.1093/dnares/11.1.27>.
- Hummon AB, Richmond TA, Verleyen P, Barrerman G, Huybrechts J, Ewing MA, Vierstraete E, Rodriguez-Zas SL, Schoofs L et al. (2006) From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science*, 314(5799), 647-649. <https://doi.org/10.1126/science.1124128>.
- Schoofs L, De Loof A, Van Hiel MB (2017) Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annual Review of Entomology*, 62, 35-52. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035500>.
- Nässel DR, Winther AM (2010) *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*, 92(1), 42-104. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.010>.
- Hanlon CD, Andrew DJ (2015) Outside-in signaling-a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *Journal of Cell Science*, 128(19), 3533-3542. <https://doi.org/10.1242/jcs.175158>.
- Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, Sattelle DB, De La Fuente J, Ribeiro JM et al. (2016) Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms10507>.
- Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, De Graaf DC, Debyser G, Deng J et al. (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*,



- 15(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-86>.
10. Xu G, Gu GX, Teng ZW, Wu SF, Huang J, Song QS, Ye GY, Fang Q (2016) Identification and expression profiles of neuropeptides and their G protein-coupled receptors in the rice stem borer *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports*, 6, 28976. <https://doi.org/10.1038/srep28976>.
11. Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular Biotechnology*, 39(3), 239-264. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9031-1>.
12. Talekar N, Shelton A (1993) Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 275-301. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.001423>.
13. Cho JM, Kim KJ, Kim SM, Han DS, Hur JH (2001) Diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in Kangwon alpine vegetable crop lands. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 5(1), 30-35.
14. Hemingway J, Ranson H, Magill A, Kolaczinski J, Fornadel C, Gimnig J, Coetzee M, Simard F, Roch DK et al. (2016) Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control? *The Lancet*, 387(10029), 1785-1788. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00417-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00417-1).
15. Sparks TC, Lorschach BA (2017) Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. *Pest Management Science*, 73(4), 672-677. <https://doi.org/10.1002/ps.4457>.
16. Audsley N, Down RE (2015) G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 67, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.07.014>.
17. Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
18. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B et al. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494-1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.
19. Kim KH, Lee DW (2018) Analysis of gene expression in larval fat body of *Plutella xylostella* under high temperature. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 37(4), 324-332. <https://doi.org/10.5338/kjea.2018.37.4.43>.
20. Meyer JM, Ejendal KF, Avramova LV, Garland-Kuntz EE, Giraldo-Calderón GI, Brust TF, Watts VJ, Hill CA (2012) A "genome-to-lead" approach for insecticide discovery: pharmacological characterization and screening of *Aedes aegypti* D(1)-like dopamine receptors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), e1478. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001478>.
21. Roeder T (2005) Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annual Review of Entomology*, 50, 447-477. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130404>.
22. Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Blenau W, Grimmeliikhuijzen CJ (2006) A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Progress in Neurobiology*, 80(1), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.07.005>.
23. Fuchs S, Rende E, Crisanti A, Nolan T (2014) Disruption of aminergic signalling reveals novel compounds with distinct inhibitory effects on mosquito reproduction, locomotor function and survival. *Scientific Reports*, 4, 5526. <https://doi.org/10.1038/srep05526>.
24. Kamhi JF, Arganda S, Moreau CS, Traniello JFA (2017) Origins of aminergic regulation of behavior in complex insect social systems. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, 74. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00074>.
25. Huser A, Eschment M, Güllü N, Collins KAN, Böppele K, Pankevych L, Rolsing E, Thum AS (2017) Anatomy and behavioral function of serotonin receptors in *Drosophila melanogaster* larvae. *PLoS One*, 12(8), e0181865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181865>.
26. Kinney MP, Panting ND, Clark TM (2014) Modulation of appetite and feeding behavior of the larval mosquito *Aedes aegypti* by the serotonin-selective reuptake inhibitor paroxetine: shifts between distinct feeding modes and the influence of feeding status. *Journal of Experimental Biology*, 217(6), 935-943. <https://doi.org/10.1242/jeb.094904>.
27. Thamm M, Balfanz S, Scheiner R, Baumann A, Blenau W (2010) Characterization of the 5-HT 1A receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) and involvement of serotonin in phototactic behavior. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(14), 2467-2479. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0350-6>.
28. Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 540-550. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>.

29. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121-127.  
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80165-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80165-x).
30. Moschovakis GL, Bubke A, Friedrichsen M, Ristenpart J, Back JW, Falk E, Kremmer CS, Förster R (2019) The chemokine receptor CCR7 is a promising target for rheumatoid arthritis therapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(10), 791-799.  
<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0056-5>.
31. Hauser F, Grimmlikhuijzen CJP (2014) Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protostomia. *General and Comparative Endocrinology*, 209, 35-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.009>.
32. Tian S, Zandawala M, Beets I, Baytemur E, Slade SE, Scrivens JH, Elphick MR (2016) Urbilaterian origin of paralogous GnRH and corazonin neuropeptide signalling pathways. *Scientific Reports*, 6(1), 28788.  
<https://doi.org/10.1038/srep28788>.
33. Veenstra JA (1989) Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the American cockroach. *FEBS Letters*, 250(2), 231-234.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80727-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80727-6).
34. Oryan A, Wahedi A, Paluzzi JPV (2018) Functional characterization and quantitative expression analysis of two GnRH-related peptide receptors in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(2), 550-557.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.088>.
35. Marchal E, Schellens S, Monjon E, Bruyninckx E, Marco HG, Gäde G, Vanden Broeck J, Verlinden H (2018) Analysis of peptide ligand specificity of different insect adipokinetic hormone receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 542.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19020542>.
36. Schwabe T, Bainton RJ, Fetter RD, Heberlein U, Gaul U (2005) GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell*, 123(1), 133-144.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.037>.
37. Brown MR, Crim JW, Arata RC, Cai HN, Chun C, Shen P (1999) Identification of a *Drosophila* brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides*, 20(9), 1035-1042.  
[https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(99\)00097-2](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(99)00097-2).
38. Nässel DR, Wegener C (2011) A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? *Peptides*, 32(6), 1335-1355.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.03.013>.
39. Lingo PR, Zhao Z, Shen P (2007) Co-regulation of cold-resistant food acquisition by insulin- and neuropeptide Y-like systems in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, 148(2), 371-374.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.010>.
40. Krashes MJ, DasGupta S, Vreede A, White B, Armstrong JD, Waddell S (2009) A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell*, 139(2), 416-427.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.035>.
41. Xu J, Li M, Shen P (2010) A G-protein-coupled neuropeptide Y-like receptor suppresses behavioral and sensory response to multiple stressful stimuli in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2504-2512.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3262-09.2010>.
42. Hermann C, Saccon R, Senthilan PR, Domnik L, Dircksen H, Yoshii T, Helfrich-Förste C (2013) The circadian clock network in the brain of different *Drosophila* species. *Journal of Comparative Neurology*, 521(2), 367-388. <https://doi.org/10.1002/cne.23178>.
43. Ament SA, Velarde RA, Kolodkin MH, Moyse D, Robinson GE (2011) Neuropeptide Y-like signalling and nutritionally mediated gene expression and behaviour in the honey bee. *Insect Molecular Biology*, 20(3), 335-345.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01068>.
44. Huang Y, Crim JW, Nuss AB, Brown MR (2011) Neuropeptide F and the corn earworm, *Helicoverpa zea* a midgut peptide revisited. *Peptides*, 32(3), 483-492.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.09.014>.
45. Setzu M, Biolchini M, Lilliu A, Manca M, Muroi P, Poddighe S, Bass C, Angioy AM, Nichols R (2012) Neuropeptide F peptides act through unique signaling pathways to affect cardiac activity. *Peptides*, 33(2), 230-239.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.005>.
46. Garczynski SF, Crim JW, Brown MR (2005) Characterization of neuropeptide F and its receptor from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Peptides*, 26(1), 99-107.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.07.014>.
47. Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Park Y, Li B, Tanaka Y, Predel R, Neupert S, Schachtner J et al. (2008) A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(1), 142-165.  
<https://doi.org/10.1016/j.yfrme.2007.10.003>.
48. Yamanaka N, Yamamoto S, Žitňan D, Watanabe K, Kawada T, Satake H, Kaneko Y, Hiruma K, Tanaka Y

- et al. (2008) Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. *PLoS One*, 3(8), e3048.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003048>.
49. Fan Y, Sun P, Wang Y, He X, Deng X, Chen X, Zhang G, Chen X, Zhouet N (2010) The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8), 581-591. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.005>.
50. Brody T, Cravchik A (2000) *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), F83-F88.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.F83>.
51. Liu YJ, Yan S, Shen ZJ, Li Z, Zhang XF, Liu XM, Zhang QW, Liu XX (2018) The expression of three opsin genes and phototactic behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): evidence for visual function of opsin in phototaxis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 96, 27-35.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.006>.
52. Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*, 411(6835), 302-305.  
<https://doi.org/10.1038/35077075>.
53. Tancharoen S, Sarker KP, Imamura T, Biswas KK, Matsushita K, Tatsuyama S, Travis J, Porempa J, Torii M et al. (2005) Neuropeptide release from dental pulp cells by RgpB via proteinase-activated receptor-2 signaling. *The Journal of Immunology*, 174(9), 5796-5804.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5796>.
54. Clynen E, Husson SJ, Schoofs L (2009) Identification of new members of the (short) neuropeptide F family in locusts and *Caenorhabditis elegans*. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1163(1), 60-74.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03624>.
55. Garczynski SF, Brown MR, Crim JW (2006) Structural studies of *Drosophila* short neuropeptide F: occurrence and receptor binding activity. *Peptides*, 27(3), 575-582.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.06.029>.
56. Dillen S, Verdonck R, Zels S, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J (2014) Identification of the short neuropeptide F precursor in the desert locust: evidence for an inhibitory role of sNPF in the control of feeding. *Peptides*, 53, 134-139.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.09.018>.
57. Wu SF, Yu HY, Jiang TT, Gao CF, Shen JL (2015) Superfamily of genes encoding G protein-coupled receptors in the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Insect Molecular Biology*, 24(4), 442-453. <https://doi.org/10.1111/imb.12171>.
58. Kubli E, Bopp D (2012) Sexual behavior: how sex peptide flips the postmating switch of female flies. *Current Biology*, 22(13), R520-R522.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.058>.
59. Chen PS, Stumm-Zollinger E, Aigaki T, Balmer J, Bienz M, Bohlen P (1988) A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*, 54(3), 291-298.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90192-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90192-4).
60. Isaac RE, Li C, Leedale AE, Shirras AD (2010) *Drosophila* male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1678), 65-70.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1236>.
61. Domanitskaya EV, Liu H, Chen S, Kubli E (2007) The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females. *The FEBS Journal*, 274(21), 5659-5668.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06088>.
62. Fryxell KJ, Meyerowitz EM (1991) The evolution of rhodopsins and neurotransmitter receptors. *Journal of Molecular Evolution*, 33(4), 367-378.  
<https://doi.org/10.1007/bf02102867>.
63. Li XJ, Wolfgang W, Wu YN, North RA, Forte M (1991) Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. *The EMBO Journal*, 10(11), 3221-3229.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04885.x>.
64. Altstein M, Nassel DR (2010) Neuropeptide signaling in insects. *Neuropeptide Systems as Targets for Parasite and Pest Control*, 692, 155-165.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6902-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6902-6_8).
65. He X, Zang J, Li X, Shao J, Yang H, Yang J, Huang H, Chen L, Shi L, Zhu C, Zhang G, Zhou N (2014) Activation of BNGR-A24 by direct interaction with tachykinin-related peptides from the silkworm *Bombyx mori* leads to the G(q)- and G(s)-coupled signaling cascades. *Biochemistry*, 53(42), 6667-6678.  
<https://doi.org/10.1021/bi5007207>.
66. Gui S, Jiang H, Xu L, Pei Y, Liu X, Smagghe G, Wang J (2017) Role of a tachykinin-related peptide and its receptor in modulating the olfactory sensitivity in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 71-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.12.002>.
67. West AP, Llamas LL, Snow PM, Benzer S, Bjorkman

- PJ (2001) Crystal structure of the ectodomain of Methuselah, a *Drosophila* G protein-coupled receptor associated with extended lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3744-3749. <https://doi.org/10.1073/pnas.051625298>.
68. Patel MV, Hallal DA, Jones JW, Bronner DN, Zein R, Caravas J, Husain Z, Friedrich M, Vanberkum MFA (2012) Dramatic expansion and developmental expression diversification of the Methuselah gene family during recent *Drosophila* evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 318(5), 368-387. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22453>.
69. Lin YJ, Seroude L, Benzer S (1998) Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* Mutant methuselah. *Science*, 282(5390), 943-946. <https://doi.org/10.1126/science.282.5390.943>.
70. Kidd T, Abu-Shumays R, Katzen A, Sisson JC, Jiménez G, Pinchin S, Sullivan W, Ish-Horowicz D (2005) The  $\epsilon$ -subunit of mitochondrial ATP synthase is required for normal spindle orientation during the *Drosophila* embryonic divisions. *Genetics*, 170(2), 697-708. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.037648>.
71. Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM et al. (2002) G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298, 176-178. <https://doi.org/10.1126/science.1076196>.
72. Li C, Zhang Y, Yun X, Wang Y, Sang M, Liu X, Hu X, Li B (2014) Methuselah-like genes affect development, stress resistance, lifespan and reproduction in *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology*, 23(5), 587-597. <https://doi.org/10.1111/imb.12107>.
73. Zhang Z, Wang H, Hao C, Zhang W, Yang M, Chang Y, Li M (2016) Identification, characterization and expression of methuselah-like genes in *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothriideridae). *Genes*, 7(10), 91. <https://doi.org/10.3390/genes7100091>.
74. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR (2009) Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*, 135(3), 561-571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.040>.
75. Şahbaz BD, Iyison NB (2019) Prediction and expression analysis of G protein-coupled receptors in the laboratory stick insect, *Carausius morosus*. *Turkish Journal of Biology*, 43(1), 77-88. <https://doi.org/10.3906/biy-1809-27>.
76. Coast GM, Orchard I, Phillips JE, Schooley DA (2002) Insect diuretic and antidiuretic hormones. *Advances in Insect Physiology*, 29, 279-409. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(02\)29004-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(02)29004-9).
77. Furuya K, Milchak RJ, Schegg KM, Zhang J, Tobe SS, Coast GM, Schooley DA (2000) Cockroach diuretic hormones: characterization of a calcitonin-like peptide in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6469-6474. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6469>.
78. Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, Taghert PH (2005) A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *Journal of Experimental Biology*, 208(7), 1239-1246. <https://doi.org/10.1242/jeb.01529>.
79. Zandawala M, Li S, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJ, Orchard I (2013) Isolation and functional characterization of calcitonin-like diuretic hormone receptors in *Rhodnius prolixus*. *PLoS One*, 8(11), e82466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082466>.
80. Johnson EC, Bohn LM, Taghert PH (2004) *Drosophila* CG8422 encodes a functional diuretic hormone receptor. *Journal of Experimental Biology*, 207(5), 743-748. <https://doi.org/10.1242/jeb.00818>.
81. Apone F, Ruggiero A, Tortora A, Tito A, Grimaldi MR, Arciello S, Andrenacci D, Di Lelio I, Colucci G (2014) Targeting the diuretic hormone receptor to control the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Science*, 14(1), 87. <https://doi.org/10.1093/jis/14.1.87>.
82. Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, Mlodzik M (2000) Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science*, 288(5472), 1825-1828. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1825>.
83. Malbon CC (2004) Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, 1048-1058. <https://doi.org/10.2741/1308>.
84. Organisti C, Hein I, Grunwald Kadow IC, Suzuki T (2015) Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, cooperates with Netrin/Frazzled in *Drosophila* midline guidance. *Genes to Cells*, 20(1), 50-67. <https://doi.org/10.1111/gtc.12202>.
85. Wasserscheid I, Thomas U, Knust E (2007) Isoform-specific interaction of Flamingo/Starry Night with excess Bazooka affects planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Developmental Dynamics*, 236(4), 1064-1071. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21089>.