

韓國産 도롱뇽(*Hynobius leechi* BOULENGER)의
初期發生段階에 있어서의 遊離 아미노酸의 定性分析

姜 永 善·河 斗 鳳·韓 元 澤

(서울대학교 文理科大學 動物學科)

Qualitative Analysis of the Free Amino Acids during the
Early Developmental Stages of *Hynobius leechi* BOULENGER

KANG, Yung Sun, HA, Doo Bong and HAN, Won Taik

(Dept. of Zoology, College of Liberal Arts and Sciences, Seoul National University)

(1961年 12月 1日接受)

SUMMARY

Free amino acids at five different developmental stages (Gastrulation...Hatching-out stage) of *Hynobius leechi* BOULENGER were analyzed qualitatively by the use of paper partition chromatography. It was found that the number of free amino acids increased as the development proceeded.

The free amino acids identified at each stages are as follows:

Gastrulation stage: Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid, Histidine, Methionine.

Neural plate formation stage: Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Tryptophan.

Middle tail-bud stage: Alanine, Arginine, Asparagine, Aspartic acid, Citrulline, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Hydroxyproline, Proline, Leucine, Methionine, Ornithine, Phenylalanine, Serine, Threonine, Tryptophan.

Late tail-bud stage: Alanine, Arginine, Asparagine, Aspartic acid, Citrulline, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Hydroxyproline, Leucine, Methionine, Ornithine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tryptophan, Valine.

Hatching-out stage: the same with the late tail-bud stage.

It seems probable that the metabolic systems of amino acids before and after the middle tail-bud stage are quite different from each other. Before the middle tail-bud stage, the reaction system of amino acids is thought not to be completed while after that stage the system has been completed, because in the former period of the development, the number of free amino acids increased rapidly with the development, and after that stage, there is practically no change in the number of free amino acids.

I. 緒 論

兩棲類 受精卵의 發生과 變態에 關한 形態學의 研究는 많으나 發生過程과 그에 따르는 amino酸分布相에 關한 研究는 最近 生化學의 方法論의 發達로서 겨우 始作되고있다. 餘他の 兩棲類에서와 마찬가지로 도롱뇽의 受精卵도 外部와 營養物質의 直接 交換없이 卵黃의 形態로서 가지고 있던 窒素含有物質과 代謝材料를

使用하여 發生 即 細胞의 增殖과 器官分化를 完成한은 周知의 事實이다(Gregg & Ballentine, 1946).

일찍이 Takamatsu (1929)는 *Hynobius*의 初期發生 四週時期에서 urea를 檢出하였으며 同一한 結果를 Brachet (1939)도 確認하였다. Li & Roberts (1949)는 개구리胚의 遊離 amino酸과 peptide의 組成을 分析報告한바 있으며, Fujiwara (1954)는 *Rana nigromaculata*의 卵巢卵을 chromatographic analysis로서 amino 酸

組成을 分析하였던바 alcohol抽出物로서 aspartic acid, glutamic acid, methionine, valine, leucine, 및 phenylalanine을 檢出하였으며, 특히 aspartic acid와 glutamic acid가 多量으로 存在함을 보았다. 마찬가지로 Holtfreter, et al. (1950)도 여러 種의 兩棲類卵과 胚의 amino酸 組成을 chromatography로 分析報告하고 있다. Deuchar (1957)는 *Xenopus laevis*를 使用하여 初期胚에서 遊離 amino酸의 組成과 卵割期로부터 胞胚期까지의 遊離 amino 酸의 消長關係, 특히 glutamic acid, glutamine 및 aspartic acid의 消長關係를 定量分析한 결과 初期胚에서 胞胚期에 이르는동안 glutamic acid와 glutamine은 증가를 보였고 aspartic acid는 감소함을 보았다. Eakin, et al. (1954), Chen (1956) 등은 *Rana*와 *Triturus*에서, 또 Rickenbacher (1954)는 兩棲類에서 Deuchar (1957)와 同一한 結果를 報告한바 있다.

또한 Eakin, et al. (1950)은 兩棲類 發生胚의 蛋白合成에 關한 報告를 했으며, Friedberg (1950),와 Eakin(1949)은 glycine-C¹⁴을 使用하여 兩棲類 初期胚에서 蛋白合成의 機作을 究明했으며, Barth, et al. (1950, 1951)은 개구리알의 卵黃과 ATP와의 關係, 即 에너지代謝關係를 밝힌바 있다. Gregg & Ballentine (1946)은 개구리의 胚發生에서 全體의인 窒素代謝過程 即 總窒素量에 變化가 없었다는것을 報告한바 있다. Boell, et al. (1937)은 兩棲類의 胞胚를 使用하여 anaerobic glycolysis를 究明하였으며, 또한 Boell & Weber (1955)는 兩棲類 發生卵의 mitochondria에서 cytochrome oxidase activity를 測定하였고 Gregg & Ornstein(1951)은 兩棲類 胞胚片으로서 無機 ammonia가 合成됨을 報告하였다.

以上の 報告에 依하면 初期發生段階에서의 蛋白質代謝 및 에너지代謝에 對하여 많은 研究가 進行되고 있으며 一般적으로 確定되고 있는것은 發生進行에 따라서 mono-basic amino酸이 量的으로 감소하고 di-basic amino酸이 증가를 보인다는點이다. 그리고 또한 發生段階에 따른 遊離 amino酸 種類를 보면 囊胚期以後 器官形成期에 이르러 그에 必要한 蛋白合成이 活潑해 지면서 必然적으로 그에 關與하는 amino酸의 顯著한 增加를 보인다는點도 알려져 있다.

兩棲類發生과 amino 酸代謝를 究明하는 一翼으로서 本實驗에서는 韓國産도롱뇽(*Hynobius leechi* BOULENGER)를 材料로하여 發生過程에 따른 遊離 amino酸 分布相의 變化를 究明코져 paper partition chromato-

graphy 法으로서 發生初期부터 孵化直前까지의 遊離 amino酸 分布變化를 定性的으로 調査하였다.

本實驗을 爲하여 많은 協助를 아끼지 않으신 서울大學校文理科大學 動物學科의 여러 先輩諸位의 勞苦를 깊이 感謝드리는 바이다.

II. 材料 및 方法

實驗材料는 北漢山 도롱뇽 *Hynobius leechi* BOULENGER를 使用하였으며 室溫(17°—24°C)에서 發生시켰다. 解剖顯微鏡(x40)을 使用하여 各段階를 區分하였으며 Witchi & Harrison (1951)의 發生段階 區分法에 依據하여 다음 5個段階를 選擇 設定하였다.

- 1) 囊胚期 (Gastrulation stage)
- 2) 神經板形成期 (Neural plate formation stage)
- 3) 尾中芽期 (Middle tail-bud stage)
- 4) 尾芽末期 (Late tail-bud stage)
- 5) 孵化期 (Hatching-out stage)

上記 各發生段階의 受精卵에서 jelly 狀의 vitelline-membrane을 除去하고 autolysis를 抑制하기 爲하여 少量의 ether를 加하여 90°—100°C의 dry oven속에서 20—30分間 넣어 乾燥시켜서 3g의 乾燥物을 얻었다. 이 乾燥物을 soxhlet extracting으로서 ether를 使用하여 24時間동안 脂肪을 完全히 除去하였고 Stein & Moore (1951, 1954)法에 따라 다시 80% ethanol 속에서 24時間 放置해 두었다가 濾過시킨後 그 濾液을 이온交換樹脂 (Merck No. 5, cation ion resin)로 遊離amino酸을 分離시켰다. 以上과 같이 分離된 amino酸溶液에서 NH₄-OH와 水分을 蒸發시키기 위하여 steam-bath 위에서 濃縮시켜 約 3cc의 amino酸溶液을 얻어 paper partition chromatography用 sample로 使用하였다.

Paper partition chromatography用 濾紙로는 Whatman No. 4 (23×24 cm)를 使用하였으며, 一次元 展開溶媒로서 水飽和 phenol: H₂O (7:3, v/v)의 下澄液, 二次元展開溶媒로서 n-butanol-醋酸-물(4:3:1, v/v/v)의 混合液에서 上澄液을 使用하였다. 展開時間은 室溫(21°—24°C)에서 一次元に 7—9時間, 二次元に 3—5時間 所要되었으며 每回 標準amino酸과 同時에 展開시켰다.

이 濾紙를 80°C의 dry oven에서 完全히 乾燥시킨 다음에 0.2% ninhydrine의 acetone溶液으로 發色시켰으며 標準 amino 酸의 Rf値과 比較하여 個個의 amino 酸을 固定하였다

III. 結 果

韓國產 도롱뇽 受精卵의 發生過程 5段階에 있어서의 遊離 amino酸 分布相을 paper partition chromatography法에 의하여 調査한結果는 Table 1, Fig. 1~6과같다.

襄胚期에서는 alanine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, histidine, methionine이 檢出되었으며 神經板形成期에 이르러서는 phenylalanine, proline, serine, tryptophan 이 檢出되었다. 尾芽中期에서는 arginine, hydroxyproline, leucine, ornithine, threonine 이 添加

Table 1. Free amino acids detected in five different developmental stages of *Hynobius leechi* BOULENGER.

Stage amino acids	Gast.	Neural	Middle	Late	Hatch
Alanine	++	++	++	++	++
Arginine			++	++	++
Asparagine			++	++	++
Aspartic acid	++	++	++	++	++
Citrulline			++	++	++
Glutamic acid	++	++	++	++	++
Glycine	++	++	++	++	++
Histidine	+*	+*	++	++	++
Hydroxyproline			+*	+*	++
Leucine			++	++	++
Methionine	+*	++	++	++	++
Ornithine			++	++	++
Phenylalanine		+*	++	++	++
Proline		+*	++	++	++
Serine		++	++	++	++
Threonine		++	++	++	++
Tryptophan		++	++	++	++
Valine			++	++	++
Total	6	10	17	18	18
Unknowns	3	2	3	4	3

Remark: * indicates amino acids individually detected.

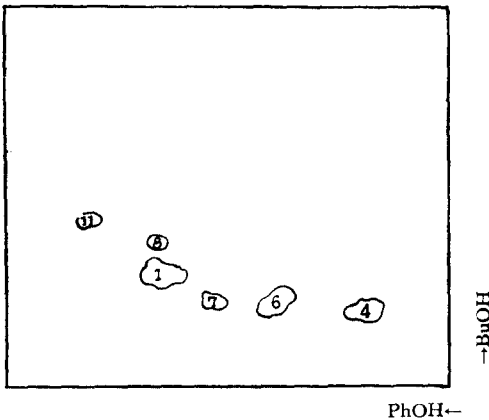


Fig. 1. Chromatogram of free amino acids in gastrulation stage.

되었다. 尾芽末期에서는 分布相이 尾芽中期와 同一하였으나, 다만 valine이 追加되었다. 孵化期에서는 全히 尾芽末期의 分布相과 同一하였다.

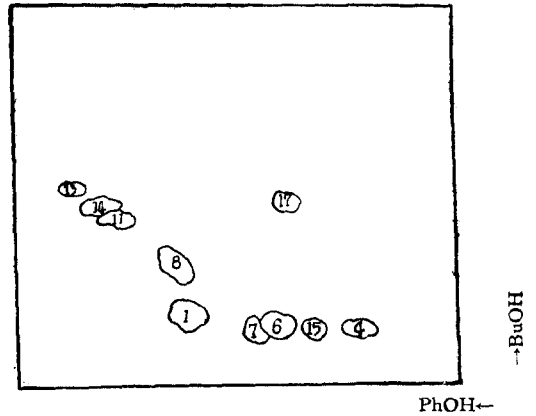


Fig. 2. Chromatogram of free amino acids in neural plate formation stage.

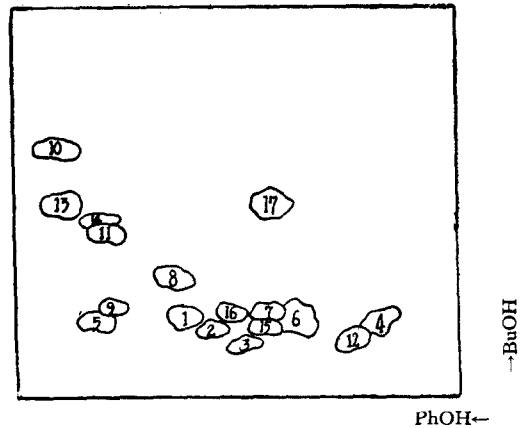


Fig. 3. Chromatogram of free amino acids in middle tail-bud stage.

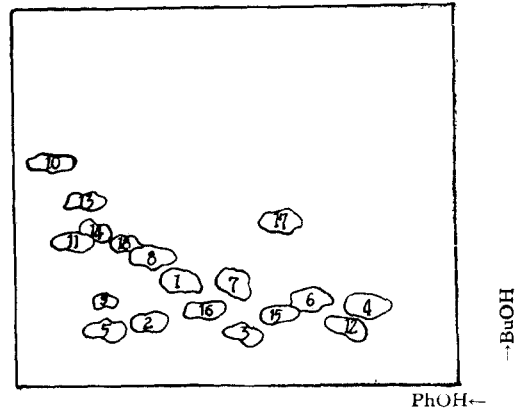


Fig. 4. Chromatogram of free amino acids in late tail-bud stage.

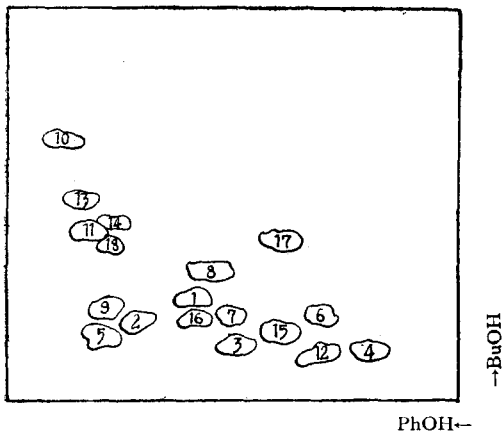


Fig. 5. Chromatogram of free amino acids in hatching-out stage.

Remarks of chromatograms

- | | |
|-------------------|------------------|
| 1. Alanine | 2. Arginine |
| 3. Asparagine | 4. Aspartic acid |
| 5. Citrulline | 6. Glutamic acid |
| 7. Glycine | 8. Histidine |
| 9. Hydroxyproline | 10. Leucine |
| 11. Methionine | 12. Ornithine |
| 13. Phenylalanine | 14. Proline |
| 15. Serine | 16. Threonine |
| 17. Tryptophan | 18. Valine |

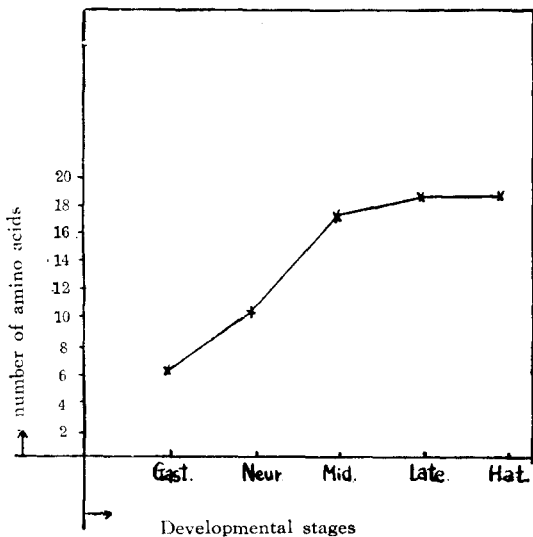


Fig. 6. Change in number of free amino acids during the development.

IV. 考 察

Chromatogram에 나타난 amino酸을 同定하기 위하

여 本實驗에서 使用한 標準 amino 酸은 18種으로서 alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, citrulline, glutamic acid, glycine, histidine, hydroxyproline, leucine, methionine, ornithine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, valine이었다. 따라서 本實驗에서 確認同定할수 있었던 amino 酸의 種類는 上記 18種에 局限되며 使用한 標準 amino酸 以外의 amino酸이 濾紙에 나타난것은 同定할수가 없어서 不得已 data에서 除外되었다. Table 1에서未知物로 나타난 것 中에는 이러한 amino酸도 包含되었으리라고 생각된다.

生物體에 遊離 amino酸의 pool이 存在한다는것은 個個의 amino酸이 各己 特定의 代謝過程을 밟기 위하여 또 特定 蛋白質의 合成을 爲한 precursor가 되기 爲하여, 貯藏 또는 攝取한 物質에서 遊離 amino酸이 遊離된 것으로 생각된다. 따라서 이 遊離 amino酸 pool의 pattern은 그 生體組織의 物質代謝의 一面을 보이는 것이다. 그러므로 上記 6 種의 amino酸이 發生初期에서 부터 繼續하여 存在한다는 事實은 發生初期의 胚內物質代謝에 이 6種의 amino酸이 다른 amino 酸보다 더욱 깊은 關聯을 갖고 있는 것으로 생각된다.

本實驗에서 얻은 結果에 依하면 첫段階인 囊胚期에서 alanine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, methionine 이 명백히 檢出되었다. 이 여섯가지 amino酸은 全發生段階에 걸쳐서 恒常 明白히 나타나고 있다. 이 中에서 alanine, aspartic acid, glutamic acid는 Meister (1954)가 報告한바와 같이 生體組織內에서 transamination 과 deamination 過程에 絕對로 필요한 amino酸으로서 受精以後 계속하여 存在하고 있었다고 본다. glycine, histidine, methionine도 Chen (1956)과 Deuchar(1955)가 兩棲類에서 報告한것과 마찬가지로 發生初期에서부터 孵化時期까지의 全段階에 걸쳐 發生卵의 物質代謝에 깊은 關聯을 갖는다는 것을 의미한다.

Deuchar(1957)가 *Xenopus laevis* 發生初期胚에서 量的의 消長關係를 調査했던 遊離 amino酸은 glutamic acid, glutamine, aspartic acid의 3種이었으며, 이中에서 glutamic acid, glutamine은 發生進行에 따라서 量的으로 증가하고 aspartic acid는 감소한다고 하였다.

本實驗에서 alanine, glycine, glutamic acid, aspartic acid, histidine, methionine 이檢出된 첫 段階는 Deuchar(1957)가 實驗하였던 胞胚期 直後の 段階 即 囊胚期에 해당한다. Glutamic acid는 動物組織內에서의 transamination에 가장 많이 關與하는 物質인바의 De-

uchar의 實驗結果와 마찬가지로 glutamic acid가 發生初期부터 檢出된것은 卵黃內에 있던 窒素貯藏物(nitrogen reserve)이 그構成 아미노酸으로 分解되고 이 아미노酸은 transamination에 의하여 specific protein으로 合成되어 細胞增殖에 사용되기 때문이라고 생각되며, 또한 Fruton, et al. (1957) Hanes, et al. (1950) 등의 報告에서 蛋白質合成은 glutamine, glutathione, γ -glutamyl peptide의 transpeptidation에 의하여 이루어진다고 한바와 마찬가지로 glutamic acid는 窒素含有物質이 轉移되어 細胞增殖에 사용되는 transamination 過程에 활발히 關與하기 때문에 發生初期부터 檢出되었다고 생각된다.

Aspartic acid도 이 時期에서 檢出되었는데, Chen (1956)의 報告에 의하면 *Triton*에서도 囊胚期以後 aspartic acid가 증가한다고 했으며 Gustafson & Hjelte (1951)는 성체는 囊胚期로부터 蛋白質合成이 왕성하게 시작된다고 報告했는데, 本實驗에서도 이 時期로부터 檢出되었다. Lagerkvist (1951)는 發生初期의 細胞增殖에 있어서 aspartic acid의 감소는 이 아미노酸이 nucleotide合成에 關與하여 核酸合成에 쓰이기 때문이라고 하였다. 細胞增殖은 核酸合成의 결과라고 볼수 있으므로 aspartic acid는 transamination에 關與하는 外에도 nucleotide 合成에 쓰임으로써 細胞增殖에 關與하게 된다. Meister (1954)가 指摘한바와 같이 aspartic acid도 glutamic acid와 마찬가지로 transamination, deamination에 가장 활발히 關與하는 物質로 여러가지 다른 아미노酸으로 轉移되는 中間物質로 나타났다고 본다.

Glycine 이 孵化期까지 繼續적으로 檢出되는것은 이 아미노酸이 "succinate-glycine cycle"을 통하여 purine 誘導體, porphine誘導體 및 ribose를 形成한다고 볼수 있다. Abrams, et al. (1948)은 glycine이 purine의 precursor가 된다는것을 밝혀서 細胞增殖에 따른 核酸合成에 必要한 purine合成에 glycine이 關與함을 알았다. Sirlin & Wadding (1954)은 glycine- C^{14} 을 사용하여 *Newt* 發生에서 nuclear uptake를 確認하였으며, 同一한 結果를 Friedberg & Eakin (1949)도 報告한바가 있다. Boell & Needham (1937)은 兩棲類의 囊胚部分에서 anaerobic glycolysis의 存在를 確認한바에 비추어 이 時期에 이르러 cytochrome 系酸化酵素의 合成과 anaerobic oxidation이 일어나고 있다고 생각할 수 있으므로 cytochrome 系酸化酵素合成에 porphin 誘導體가 關與하리라고 推測된다. 또한 Boell & Weber (195

5)가 報告한바 cytochrome 系酸化酵素의 活性이 發生進行에 따라서 上昇한다는 사실과도 부합된다.

Ribose는 purine 誘導體들과 함께 nucleotide合成에 쓰이고 窮極에는 細胞增殖에 關與하는것으로 보인다. 이와같이 cytochrome系酵素, purine誘導體, ribose 등은 胚의 發生初期부터 必須不可缺의 物質들일 것이라고 생각되므로 이들 物質의 precursor인 glycine이 初期發生卵에서 孵化期까지 存在하고 있는것으로 보인다. 또한 glycine은 guanidoacetate를 거쳐서 ATP와 함께 一部 energy供給物質 合成에 쓰이는 것으로 보이는데, 이는 Barth & Barth (1951)의 報告에 의하면 yolk와 ATP의 關係에 비추어 알수 있으며, 또한 Barth & Jaeger (1950)는 phosphate compound가 卵黃으로부터 ATP에 의하여 새로 合成되는 蛋白質로 轉移되는 事實로부터 推測할수가 있다.

Methionine은 體內 labile methyl group 供給源으로 알려져 있고, rhodopsin 合成 및 其他 反應系에 關與하여 choline과 creatine 合成에도 作用하는것이 알려져 있으므로 發生初期부터 繼續적으로 存在하는것으로 생각한다. 또한 Sirlin (1955)은 *Newt* 胚에서 methionine- S^{35} 가 核部位에서 吸收된다는것을 報告한바 있으며 또 Eakin, et al. (1951)은 兩棲類囊胚 構成蛋白質의 methionine- S^{35} 吸收를 測定한바가 있는데, 이로써 methionine이 이 時期에 蛋白質合成에도 關與하는것으로 생각된다.

Alfrey, et al. (1957)에 의하면, 核部分에서 alanine- C^{14} 이 核蛋白質合成에 쓰인다는것을 確認하였는데 本實驗에서 alanine 이 初期에 檢出된것은 蛋白質合成이 활발히 시작되는 이 囊胚期에서 蛋白質合成에 關與하기 때문인것으로 보인다. 또한 serine을 통한 glycine과의 可逆反應關係를 생각할수 있는데 이 時期에 serine의 存在를 檢출할수 없었던 理由로는 微量存在했기 때문인것 같다.

이 以外에 histidine 이 檢出되었는데 Kutsky, et al. (1953)에 의하면 *Rana*에서 histidine 이 卵細胞期에서는 감소를 보이던것이 囊胚期和 神經板中期까지에 증가를 보인다고 하였는데, 이것은 활발한 蛋白質合成結果 라고 보이며, 卵黃의 specific protein으로부터 formyl glutamate를 거쳐서 glutamate와 formate 合成過程의 中間物質로 나타났으리라고도 추측된다.

神經板形成期에 이르러 囊胚期에서의 6種以外에 phenylalanine, proline, tryptophan의 4種이 確認되어 도합 10種의 아미노酸이 檢出되었다. Deuchar (1955, 19

56)는 神經板形成區域인 背半部分에 glutamic acid가 高濃度로 檢出되었음을 報告하였고, Chen(1956), Kutsy (1953)도 이 時期에 glutamic acid와 glutamine의 增加를 報告하고 있는데, 本實驗에서도 神經板形成期에 亦是 glutamic acid가 存在하고 있었으나 前者들의 結果처럼 glutamic acid가 이 時期에 量的인 增加를 보였는 지에 對해서는 確認하지 못하였다. 그리고 새로히 phenylalanine의 檢出이 顯著했는데 이는 tyrosine을 거쳐서 DOPA를 形成하여 一部는 thyroxine 合成에 關與하여 孵化期 및 tadpole時期의 變態 變形을 主管하는 것으로 본다.

또한 serine과 tryptophan이 檢出되었는데 serine은 基本代謝에 여러가지로 關與하는 glycine과의 可逆反應의 結果일 것으로 보이며 tryptophan은 色素顆粒形成 및 catechol 合成에 參與하리라고 생각된다. proline은 specific protein 이 glutamic acid로 되어지는 中間產物로 나타났으리라고 보이며 또 다음 段階의 ornithine precursor로 생각할수가 있다.

尾芽中期에서는 神經板形成期の 10種以外에 arginine, asparagine, citrulline, hydroxyproline, leucine, ornithine, threonine의 7種이 確認되었다. 이 時期에서의 特色은 "urea-cycle"에 關與하는 基本 amino 酸인 arginine, citrulline, ornithine이 처음으로 檢出된 點이다. 이 3種이 이時期에서 처음으로 檢出된 것은 urea 合成이 바로 이時期에서 부터 활발하게 이루어 지는것 같이 보인다. Gregg, et al. (1951)은 兩棲類囊胚部分에서 無機 ammonia 合成實驗을 報告한바 있으며 Takamatsu (1929)는 *Hynobius* 發生 4週만에 胚內에서 처음으로 urea 檢出을 報告하였는데 이 4週란 時期가 本實驗의 尾芽中期에 該當하는것인지는 確實치 않으나 發生胚內의 "urea-cycle"은 이때부터 시작되는 것으로 보인다.

尾芽中期以後에는 amino 酸의 質的變動이 거의 없으며 다만 尾芽末期에서 valine이 添加되었을뿐 그밖에는 全히 同一한 分布相을 보이고 있었다. 即 神經板形成期까지는 細胞增殖, 器官分化 其他 物質代謝에 關與하는 amino 酸 代謝系의 準備過程이며, 尾芽中期에서는 이 反應系가 完成되어 胚內 amino 酸의 metabolic pool 이 어느 程度 steady state로 보이는데 같다.

V. 要 約

Paper partition chromatography法으로 韓國產도롱뇽의 初期發生段階(Gastrulation-hatching-out stage)에서

遊離 amino 酸을 定性的으로 調査하였다. 發生이 進行됨에 따라 amino 酸의 種類數가 증가하였는데 各段階에서 檢出된 amino 酸의 종류는 아래와 같다.

囊胚期: Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine Histidine, Methionine.

神經板形成期: phenylalanine, Proline, Serine, Tryptophan의 添加.

尾芽中期: Arginine, Asparagine, Citrulline, Hydroxyproline, Leucine, Ornithine, Threonine의 添加.

尾芽末期: Valine의 添加.

孵化期: 前 段階와 同一.

이상과 같이 發生이 進行됨에 따라 遊離 amino 酸의 種類는 증가하였고 특히 尾芽中期에 이르러 急激한 增加를 나타냈다. 이것은 尾芽中期 以前과 以後의 amino 酸 代謝系가 全히 다른것임을 示唆한 것으로 보인다. 即 囊胚期와 神經板形成期까지는 amino 酸反應系가 完成되지 못한 時期라고 보여지며 尾芽中期 以後 여러 反應系가 完成되었기 때문에 種類數의 變動이 없는 것으로 생각된다.

文 獻

- Abrams, R., E. Hammerstein and D. S'emin, 1948. Glycine as a precursor of purine in yeast. *J. Biol. Chem.*, **173**: 423-430.
- Allfrey, V. G., A. E. Mirsky and S. Osawa, 1951. Protein synthesis in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiol.*, **40**: 451.
- Barth, L. G. and L. J. Barth, 1951. The relation of adenosine-tri-phosphate to yolk utilization in the frog's egg. *J. Exp. Zool.*, **116**: 99.
- Barth, L. Jaeger. 1950. The role of adenosine-tri-phosphate in phosphate transfer from yolk to other proteins in the developing frog's egg. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**: 413.
- Boell, E., J., J. Needham and V. Rogers, 1937. Morphogenesis and metabolism studies with Cartesian Diver Ultramicrometer. I. Anaerobic glycolysis of the region of the amphibian gastrulae. *Proc. Roy. Soc., London, Series B.* **127**: 322.
- Boell, E. J. and R. Weber, 1955. Cytochrome oxidase activity in mitochondria during amphibian development. *Exp. Cell Res.*, **9**: 559.

- Brachet, J., 1939. Arch. biol., (Liege) **50**: 233.
- Chen, P. S., 1956. Metabolic changes in free amino acids and peptides during Urodele development. Exp. Cell Res., **10**: 675—686.
- Deuchar, E. M., 1955. Distribution of free amino acids in embryos of *Xenopus laevis*. Nature, **176**: 258.
- Deuchar, E. M., 1956. J. Embryol. Expl., **4**: 327.
- Deuchar, E. M., 1957. Free amino acids changes during cleavages in *Xenopus laevis* embryos. Exp. Cell Res., **14**: 84—87.
- Eakin, R. M., P. B. Kutsky and W. E. Berg, 1950. Studies in protein metabolism of the amphibian embryos. II. Free amino acids. Proc. Soc. Exp., **75**: 32—34.
- Eakin, R. M., P. B. Kuthky and W. E. Berg. 1950. Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. II. Free amino acids. Proc. Exp. Biol. and Med., **75**: 32—34.
- Eakin, R. M., P. B. Kutsky and W. E. Berg, 1951. Protein metabolism of amphibian embryo. III. Incorporation of methionine into protein of gastrulae. Proc. Exp. Biol. and Med., **78**: 502—504.
- Flickinger, R. A. and G. W. Nace, 1952. An investigation of proteins during the development of the amphibian embryo. Exp. Cell Res., **3**: 393—405.
- Friedberg, F. and R. M. Eakin, 1949. Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. I. Uptake of radioactive glycine. J. Exp. Zool., **110**: 33—46.
- Fruton, J. S., 1950. The role of proteolytic enzymes in the biosynthesis of peptide bonds. Yale J. Biol., and Med., **22**: 263—271.
- Fruton, J. S., R. B. Johnston M. Fried, 1952. Elongation of peptide chains in enzyme catalyzed transamination reactions. J. Biol. Chem., **190**: 39—53.
- Fujiwara, Y. and M. Yoshida, 1954. Chromatographic studies of the amino acids in the ovarian eggs of *Rana nigromaculata*. The Res. Bull. of Faculty of Liberal Arts, Oita Univ., (Natural Science) **3**: 28—31.
- Gregg, J. R. and R. Ballentine, 1946. Nitrogen metabolism of *Rana pipiens* during embryonic development. J. Exp. Zool., **103**—168.
- Gregg, J. R., and N. Ornstein, 1951. Anaerobic ammonia production by amphibia gastrulae explants. Biol. Bull., **102**: 22.
- Gustafson, T., and M. Hjelte, 1951. The amino acid metabolism of the developing sea urchin egg. Exp. Cell Res., **2**: 474—490.
- Hanes, C. S., F. J. R. Hird and F. A. Isherwood, 1950. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione. Nature, **166**: 288—292.
- Holtfreter, J., T. R. Koszalka and L. L. Miller, 1950. Chromatographic studies of amino acids in the eggs and embryos of various species. Exp., **1**: 453—459.
- Kutsky, P. B., R. M. Eakin, W. E. Berg and J. L. Kavanau, 1953. Protein metabolism of amphibian embryo. IV. Quantitative changes in free and non-protein amino acids. J. Exp. Zool., **124**: 263—278.
- Lagerkvist, U., P. Richard and G. Ehrensward, 1951. Acta Chem. Scand., **5**: 1212.
- Li, C. and E. Roberts, 1949. Free amino acids and peptides in frog embryos. Science, **110**: 425—426.
- Meister, A., 1954. Enzymatic transfer of alpha-amino groups. Science, **120**: 43—51.
- Rickenbacher, J. and P. S. Chen, 1954. Concerning free amino acids in amphibian development. Experimentia, **10**: 182.
- Sirlin, J. L. and C. H. Waddington, 1954. Nuclear uptake of glycine 2—C¹⁴ in the Newt embryos. Nature, **174**: 309.
- Sirlin, J. L., 1955. Nuclear uptake of methionine-S³⁵ in the Newt embryo. Experimentia, **11**: 112.
- Stein, W. H. and S. Moore, 1951. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem., **192**: 663—81.
- Stein, W. H. and S. Moore, 1954. Procedure for the chromatographic determination of amino acids on four percent cross-linked sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem., **211**: 893—906.
- Takamatsu, F., 1929. Jour. Biochem. (Tokyo) **22**: 203.
- Witchi, E., 1956. Development of Vertebrate. pp. 78.