

분화와 발생양상의 조절기작에 관한 연구 : 자외선 조사와 수정란의
회전이 배·복측 극성의 결정에 미치는 영향

정 해 문

(서울대학교 사범대학 생물교육학과)

Studies on the Mechanisms Regulating Differentiation and Pattern
Formation : Effects of UV Irradiation and Egg Rotation on the
Establishment of the Dorsal-Ventral Polarity

Hae-Moon Chung

(Department of Biology Education, College of Education, Seoul National University)

(Received May 10, 1982)

SUMMARY

A combination of ultraviolet irradiation and egg rotation was applied to Korean frogs to study the mechanisms of the establishment of the dorsal-ventral polarity. Rotation of the uncleaved egg was capable of preventing the characteristic syndromes associated with UV irradiation. As well, brief rotation of the egg before cleavage relocates the site of dorsal lip to a novel location in the embryo at gastrula stage. That is, the dorsal lip appeared on the opposite side to gravity at the rotation of the egg.

Above results were discussed with the informations obtained from other anuran and urodele species, and were interpreted in terms of regulating mechanisms for early embryogenesis.

서 론

양서류란에서 수정 직후 형태형성에 관한 최초의 중요한 변화는 배·복측 극성(dorsal-ventral polarity)의 결정이라 할 수 있으며 이로써 발생의 양상과 형태형성의 방향이 정해지게 된다. 무미양서류의 경우, 정자가 침입한 점이 배·복측의 축을 결정짓는 역할을 하는데 이는 정자 침입점의 반대편에 회색신월환이 나타나 이 부분이 미래의 배측이 되기 때문이다 (Elinson, 1975; Palecek, *et. al.*, 1979). 회색신월환 부위는 발생이 진행되어 낭배기에 도달하면 합입운동의 출발점인 원구배순부로 되며, Spemann과 Mangold는 이식실험을 통

본 연구는 1981년도 문교부 학술연구조성비의 지원으로 이루어진 것 입니다.

하여 원구배순부가 embryo의 축형성을 결정짓는 능력이 있음을 인지한 후 제 1차 형성체(primary embryonic organizer)라 명명한 바 있다 (Spemann, 1938). 따라서 회색신월환은 수정란의 극성지표로서, 또 미래의 제 1차 형성체부위로서의 중요성 때문에 그 지역의 세포질과 유도능력과의 관계가 일찍부터 많은 발생학자들의 관심의 대상으로 되어 왔다. 특히 이 지역내에서 발생의 양상을 결정짓는 요소의 위치와 유도능력을 획득하는 시기를 규명하려는 노력으로 집중되었으며 이에는 크게 두 가지 학설로 대별된다. 그 하나의 설은 이들 요소가 회색신월환 부위의 피층에 고정되어 있으며, 수정 직후부터 신경관의 유도능력을 보유하고 있다는 "피층설" (Dalcq and Pasteels, 1937; Curtis, 1960, 1962; Tompkins and Rodman, 1971)이고, 이에 맞선 다른 주장은 이들 요소가 수정란의 내부 세포질에 존재하며 유도능력도 발생이 진전됨에 따라 점차로 획득된다는 "내부 세포질설" (Ancel and Vintemberger, 1949; Nieuwkoop, 1969; Weyer, *et al.*, 1978; Gerhart, 1980)로서 지금까지 이들 두 학설을 뒷받침하는 많은 연구가 진행되어 왔다.

수정란의 배·복측 구성 형성기작에 대한 연구는 본 연구자가 자외선조사 방법 (Malacinski, *et al.*, 1975)과 아울러 최근에 개발된 수정란의 대량 회전 방법 (Kirschner, *et al.*, 1980)을 도입하여 수행한 결과 미래의 배측 부위가 본래의 예정 지역이 아닌 회전시 중력의 반대 방향에 위치하였던 새로운 부위에 임의로 결정되고 낭배기에 이르러 이 지역이 원구배순부로 되어 합입이 시작된다는 사실을 알게 되었다 (Chung and Malacinski, 1980). 이와같은 결과들은 수정란의 내부 세포질의 재배치(redistribution)로 말미암아 극성에 변화를 일으키는 것으로 보아 극성 결정요소가 회색신월환 부위의 피층에 고정되어 있기보다는 오히려 내부 세포질에 존재한다는 후자의 설을 강력히 지지하고 있다. 그러나, 수정란을 단기간 90°회전시킴으로써 배측·복측 극성의 방향을 변화시킬 수 있다는 종전의 실험 결과들은 이들 극성의 변화가 발생상 어느 시기까지 가능한지에 대하여, 또 회전을 얼마나 오랫동안 지속해야 하는지에 대하여는 밝히지 못하였다.

본 연구는 자외선 조사와 난의 90°회전 방법을 한국산 양서류난에 적용하여 수행한 결과로서 몇가지 새로운 정보를 수집하였기에 이를 보고하는 동시에 종전의 결과와 비교 검토하여 논의하였다.

재료 및 방법

양서류—본 연구에 사용된 무미양서류는 국내 서식종인 산개구리 (*Rana dybowskii*)와 참개구리 (*Rana nigromaculata*)로서 동면 직전 혹은 동면 중인 것을 강원·경기 지역에서 채집하였다. 개구리들은 채집 즉시 암·수로 분리하여 실험 전까지 4~5°C 온도 하에서 가동면 상태를 유지시킨다.

배란 및 수정—배란과 수정은 일반적으로 통용되고 있는 Hamburger (1960)의 방법을 따랐다. 배란은 성숙한 암컷의 복강내에 뇌하수체 현탁액을 주입함으로써 쉽사리 유도할 수 있으며, Petri dish에 알을 받은 후 그 위에 정충 현탁액을 뿌려 주어 많은 알을 동시에 인공 수정시킨다.

자외선 조사—수정된 알은 먼저 예리한 forcep으로 대부분의 한천층을 제거한 다음 수정 후 60분 이내에 quartz slide 위에 놓고 식물반구를 254 nm의 파장으로 24,000ergs/mm²의

양을 조사하였다 (Grant and Wacaster, 1972). 그리고 자외선에 의한 발생결합 정도는 종전의 방법을 그대로 적용하여 0에서 5까지 분류하였다 (Malacinski, *et al.*, 1975, 1977). 회전에 의한 자외선 효과의 회복 정도는 자외선을 받지않은 대조군 (control)의 평균치를 자외선 조사 후 회전시킬 실험군 (experimental)의 평균치로 나눈 값으로 표시되며, 이를 회복지수 (rescue index)로 표시하였다. 따라서 회복지수의 값이 클수록 회복 효과가 큼을 의미한다.

난의 회전—Forcep으로 한천층을 벗긴 알들은 5% Steinberg액 (1957)으로 만든 0.2% papain용액으로 약 3분간 처리하여 vitelline막을 약화시킨 다음, 3.5% L-cystein HCl (Sigma) 용액에서 3분간 가볍게 흔들여 잔여 한천을 완전히 제거한다. 이와같이 처리된 알들은 20% Ficoll (Sigma) 용액이 들어있는 1.5% agar bed에 알크기의 작은 홈을 만들어 그 속에서 90°회전시켰다 (Chung and Malacinski, 1980). 회전은 수정 후 일정 시간이 경과한 다음 시작하였으며 온도과 종류에 따라 발생 속도가 다른 관계로 수정에서 제 1 난황까지를 생리적 시간 (physiological time) 1로 정하고 그 시간에 따라 진행하였다. 일정한 기간 동안 회전된 알들은 다시 원상대로 동물반구가 위로 향하도록 되돌린 다음 낭배기에 원구배순부가 나타나는 장소를 회전 당시 중력의 방향에 대하여 검사하고, 또 회전에 의한 자외선의 회복 정도는 tailbud 시기에 조사하였다. 모든 실험 용액들은 미생물의 감염을 방지하기 위하여 고압 멸균 후 다시 penicillin과 streptomycin을 각각 400 n.g/1씩 첨가하여 사용하였다.

그림 1은 위의 실험 과정들을 모식도로 나타낸 것이다.

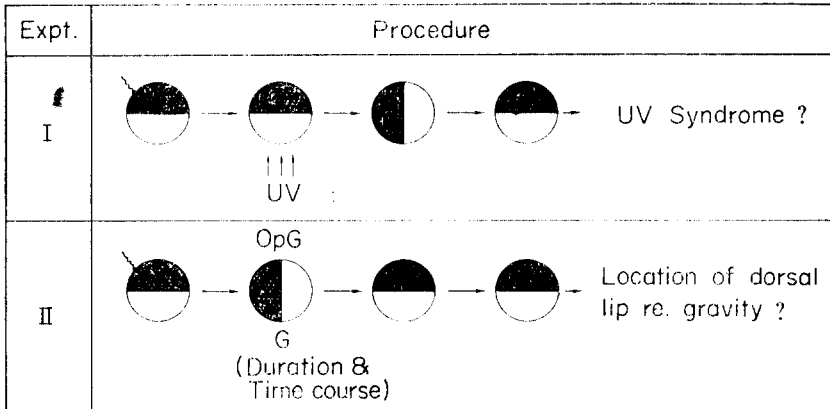


Fig. 1. Design of experiments

결 과

I. 회전에 의한 자외선 효과의 회복

자외선 실험에 사용한 실험 재료는 *Rana dybowskii*로 수정 후 60분 이내에 식물반구를 자외선으로 조사하면 전형적인 발생결합 즉, embryo의 축이 짧아지고 신경관 형성에도 이상을 유발한다. Table I의 control난에 나타난 바와 같이 수정 후 55분에 24,000 ergs/mm²의 자외선을 주었을 경우 그 평균 효과는 2.15정도로 두부의 크기가 상당히 작아지고 축의 길이도 짧아진다. 그러나 자외선을 조사한지 20분 후 (생리적 시간 0.55) 일정 기간동안 입의로 90°회전하였다가 정상 위치로 되돌리면 자외선에 의한 발생결합이 크게 줄어든다.

Table I. Rescue of UV Syndrome by random rotationMaterial: *Rana dybowskii*

Duration of rotation (min)	No. of embryo	UV effect						Average	Rescue Index
		0	1	2	3	4	5		
10	34	9	9	6	5	5	—	1.65	1.36
20	27	14	4	5	4	—	—	0.96	2.29
30	31	25	2	2	2	—	—	0.39	5.77
Control(non-rotated)	39	7	4	2	8	4	3	2.25	

발생결함의 회복은 회전 기간을 길게 할수록 그 정도가 커져, 자외선에 의한 이상 발생의 평균치가 10분간 회전할 경우 1.65, 20분의 경우 0.96, 30분의 경우 0.39로 점차 내려간다. 이와 역비례하여 회복지수는 1.36, 2.29, 5.77로 각각 늘어난다.

II. 수정란의 회전에 의한 원구배순부 위치의 변경

회전이 배·복측 극성 결정에 미치는 영향은 수정란을 정자의 침입점에 관계없이 임의로 90°회전하였다가 원위치로 되돌린 다음 낭배기에 도달했을 때 원구배순부의 위치와 회전 당시 중력의 방향과의 관계를 조사함으로써 알 수 있다. 이때 원구배순부가 중력의 반대 방향에 위치하였던 부위에 나타났을 경우를 OpG (Opposite to Gravity)로 표시하고, 그 정도를 백분율(%)로 나타내었다. 따라서 정자 침입점의 반대쪽, 즉 회색신월환 부위가 회전시 중력의 반대 방향에 위치할 가능성이 25% 정도로 항상 존재하므로 그 이상의 수치에서만 비로소 중력의 영향으로 원구배순부의 위치가 변경되었다고 볼 수 있다.

*Rana dybowskii*의 난을 수정 후 40분부터 시작하여 10분 간격으로 제 1분열이 일어나는 140분까지 회전기간을 10분, 20분, 30분 동안 달리하여 원구배순부의 위치가 변하는 정도를 조사한 결과는 Table II에 나타난 바와 같다.

먼저 회전시기(time course)를 살펴보면 회전시기가 이룰수록 효과가 크다는 것을 알 수



Table II. Site of dorsal lip by random rotation*Material: *Rana dybowskii*

Rotation (min)	No. of embryo	Initiation time after fertilization (min)										
		40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
10	Starting No	31	38	33	35	38	35	38	39	38	40	40
	OpG No	22	23	40	23	17	14	12	12	7	10	9
	OpG %	71.7	60.5	60.6	65.8	44.7	40.0	31.6	30.8	18.4	25.0	22.5
20	Starting No	34	40	36	37	35	39	34	34	35	39	39
	OpG No	28	31	28	24	17	20	10	15	9	11	13
	OpG %	82.4	77.5	77.8	64.9	48.6	51.3	29.4	44.1	25.7	28.2	32.5
30	Starting No	40	40	40	39	40	36	37	39	38	40	39
	OpG No	37	36	39	31	27	17	13	14	13	9	11
	OpG %	92.5	90.0	97.5	77.5	67.5	47.2	35.1	35.9	34.2	22.5	28.2

*1st cleavage furrow appeared 140 min after fertilization



있다. 30분 동안 회전한 경우 수정 후 60분 이내에 회전하면 90% 이상이 OpG면에 원구배순부를 형성하며, 그 이후로 점차 줄어들어 100분 이후부터는 원구배순부의 위치가 거의 변경되지 않는 것으로 나타났다. 회전기간(duration)을 10분, 20분하였을 경우에도 회복 효과는 비록 적으나 회전시간에 대한 반응은 거의 같은 양상을 보여 주고 있다. Table III과 IV는 *R. nigromaculata*를 사용하여 회전시기와 회전기간을 각각 조사한 결과이다. Table III에 나타난 바와 같이 생리적 시간 0.65 이전에 30분간 난을 회전시키면 거의 완전히 OpG 부위에 원구배순부가 나타난다. 그러나 생리적 시간 0.8에는 그 효과가 상당히 떨어지게 되

Table III. Site of the involution by 90° rotation (time course)

Time of rotation	Physiological time	 OpG	 G	(or) Side	?
60	0.5	29	0	2	1
85	0.65	21	0	1	1
96	0.8	18	4	8	
120	1	4	26	8	
170	2nd cleav.	8	6	10	
210	3rd cleav.	11	2	12	

Material: *Rana nigromaculata*

Table IV. Site of the involution by 90° rotation at P.T. 0.5 (duration)

Duration (min.)	 OpG	 G	(or) Side	?
10	14	5	10	1
20	11	3	12	1
30	20	0	3	0
40	29	0	2	1
50	22	0	5	1

Material: *Rana nigromaculata*

고 제 1 난할 이후에서는 위치 변경이 전혀없는 것으로 보인다. 따라서 회전기간의 효과는 거의 완전한 변경을 나타내는 생리적 시간 (P.T.) 0.5를 택하여 10분, 20분, 30분, 40분, 50분 동안 회전시켜 조사하였다. 그 결과는 *R. dybowskii*의 경우와 마찬가지로 30분 동안의 회전으로 충분한 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있고 그보다 짧은 기간으로도 상당한 변경을 일으키는 것을 볼 수 있었다.

논 의

자외선 조사에 의한 이상발생의 유도는 지금까지 여러 종류의 무미양서류와 유미양서류를 대상으로 조사된 바 있으나 (Malacinski *et al.*, 1978) *R. dybowskii*를 사용한 것은 본 실험이 최초의 시도로서 그 결과는 다른 종과 매우 유사한 반응을 보였다. 그러나, 발생결함의 정도는 그다지 크지 않은 수치 (평균 2.25)로 나타났는데 그 이유는 분명치 않으나 i) 식물반구가 다른 종에 비하여 더 많은 멜라닌 색소로 덮혀 있기 때문에 그로 인하여 자외선을 더 차단했을 가능성과 ii) 낮은 온도 (16~18°C)에서 embryo를 발생시킨 관계로 저온에 의한 이상발생의 회복 (Malacinski *et al.*, 1974)의 가능성을 생각할 수 있다. 난의 회전에 의한 자외선손상의 회복도 다른 종과 비슷한 반응을 보이며, 또 회전시간과 회복과의 상관관계에서도 30분에 이르기까지는 회전시간과 회복지수는 거의 정비례함을 알 수 있다. 이로써 자외선조사 결과로 나타나는 전형적인 발생결함을 회복시키는 종전의 방법, 즉 저온처리, 난 핵물질의 주입 (Malacinski *et al.*, 1974) 및 자외선을 받은 배의 원구배순부를 정상적인 원

구배순부로 대치시키는 방법 (Chung and Malacinski, 1975)에 위의 회전방법이 다시 첨가된 셈이다. 그중에서도 난의 회전방법이 거의 완전한 회복을 보임으로써 가장 효과적인 방법으로 대두되었다.

또한 정충 침입점이 미래의 배·복측 극성결정에 미치는 절대적인 영향을 제 1분열 전단기간의 회전으로 억제할 수 있다는 점도 지금까지 외국종의 양서류에서 나타난 결과와 일치한다 (Chung and Malacinski, 1981). 한편, 극성 변화가 가능한 시기는 생리적 시간 0.7~0.8까지로, 이시기부터 자외선의 효과가 급속히 떨어진다는 종전의 보고 (Malacinski *et al.*, 1975, 1978)를 고려할 때 그 시기가 일치할 현상은 매우 흥미있는 사실로서 일단 극성이 결정된 후에는 자외선 조사가 아무런 영향을 미치지 못한 것으로 해석된다. 즉, 미래의 배측은 정충 침입점과는 상관없이 회전 당시 중력의 반대방향 (OpG)에 위치하였던 부위로 항상 결정되며, 이때 회전에 의하여 극성부위의 분포에 변화를 일으킬 수 있는 부분은 단단한 피층보다는 내부 세포질로서 이들의 재배치로 말미암아 새로운 장소로 미래의 배측이 결정되는 것으로 사료된다. 내부 세포질의 이동에는 어느 정도의 시간을 필요로 하기 때문에 회전시간을 단축하면 극성의 변화도 그만큼 줄어드는 것은 당연한 결과라 하겠다.

회전에 의하여 배·복측 극성을 임의로 변경시킬 수 있다는 사실은 극성 결정 요소가 피층에 존재하며, 수정 직후 정자 침입점의 반대 방향에 나타나는 회색신월환 부위의 피층에 고정된다는 “피층설”에 크게 상반된다. 그보다도 오히려 정자의 침입으로 내부 세포질의 분포에 변화가 일어나 그 결과로 피층과 내부 세포질간에 상호작용을 일으켜 극성이 결정된다는 “내부 세포질설”을 뒷받침하는 종전의 결과 (Chung and Malacinski, 1980)를 다시 확인한 셈이다.

한편 회색신월환 부위의 피층이 수정 직후부터 신경관 유도능력을 보유하고 있다는 Curtis의 주장은 본인들에 의하여 이미 부정된 바 있다 (Malacinski *et al.*, 1979). 한가지 흥미있는 사실은 수정 직후부터 180° 역위시킨 상태에서 발생시킨 axolotl과 *Xenopus*의 난에서는 핵의 위치와 난황립의 분포가 완전히 바뀐은 물론 동·식물 반구의 난할 양상도 뒤바뀌어 원래의 식물반구쪽의 할구가 작아지고, 할강도 그 쪽으로 편재함을 알 수 있었다 (Chung and Malacinski, 1982). 이와같은 내부 세포질의 완전한 이동에 따른 난할 양상의 변화에도 불구하고 낭배 초기에 예외없이 발생이 중지되는 현상을 미루어 볼때 피층의 중요성 또한 배제할 수 없다. 따라서 내부 세포질과 피층의 중요성 내지는 양자간의 상호관계를 이해하는 일이 대단히 중요한 과제로 궁극적으로 분자 수준에서 이를 해명하여 초기 발생의 양상을 결정하는 기작을 밝혀야 할 것이다.

요 약

수정 직후 일어나는 배·복측 결정의 기작을 알아 보기 위하여 자외선의 조사와 난의 회전방법을 한국산 무미양서류에 적용하였다. 제 1분열전의 수정난을 일정기간 90°회전시키면 자외선에 의한 전형적인 발생결함을 억제시킬 수 있었다. 한편, 제 1분열 전 단기간 회전시킨 난으로부터 발생한 embryo의 원구배순부의 위치도 회전시 중력의 반대 방향에 위치하였던 새로운 장소에 형성되었다. 위의 결과는 다른 무미·유미양서류를 통하여 얻은 지식과 비교 검토하여 초기발생 기작을 이해하는데 접근하고자 하였다.

REFERENCES

- Ancel, P. and P. Vintemberger, 1949. La rotation de symétrisation, facteur de la polarisation dorso-ventrale des ébauches promodiales, dans l'oeuf des amphibiens. *Arch. Anat. Micros. Morphol. Exp.* 38:167-183.
- Chung, H.M. and G.M. Malacinski, 1975. Repair of ultraviolet irradiation damage to a cytoplasmic component required for neural induction in the amphibian egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1235-1239.
- Chung, H.M. and G.M. Malacinski, 1980. Establishment of the dorsal/ventral polarity of the amphibian embryo: Use of ultraviolet irradiation and egg rotation as probes. *Develop. Biol.* 80:120-133.
- Chung, H.M. and G.M. Malacinski, 1981. A comparative study of the effect of egg rotation (gravity orientation) and UV irradiation on anuran vs. urodele amphibian eggs. *Differentiation* 18:185-189.
- Chung, H.M. and G.M. Malacinski, 1982. Pattern formation during early amphibian development: Embryogenesis in inverted anuran and urodele eggs. *Develop. Biol.* in press.
- Curtis, A.S.G., 1960. Cortical grafting in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 8:163-173.
- Curtis, A.S.G., 1962. Morphogenetic interactions before gastrulation in the amphibian, *Xenopus laevis*—the cortical field. *J. Embryol. Exp. Morph.* 10:410-422.
- Dalcq, A. and J. Pasteels, 1937. Une conception nouvelle des bases physiologiques de la morphogénèse. *Arch. Biol.* 48:669-710.
- Elinson, R.P., 1975. Site of sperm entry and a cortical contraction associated with egg activation in the frog *Rana pipiens*. *Develop. Biol.* 47:257-268.
- Gerhart, J.C., 1980. Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo. In: *Biological Regulation and Development* (R.F. Goldberger, ed.). Plenum, New York.
- Grant, P. and J.F. Wacaster, 1972. The amphibian gray crescent region—A site of developmental information? *Develop. Biol.* 28:454-471.
- Hamburger, V., 1960. A manual of experimental embryology. The University of Chicago Press.
- Kirschner, M., J.C. Gerhart, K. Hara and G.A. Ubbels, 1980. Initiation of the cell cycle and establishment of bilateral symmetry in *Xenopus* eggs. *Symp. Soc. Develop. Biol.* 38:187-215.
- Malacinski, G.M., C.D. Allis and H.M. Chung, 1974. Correction of developmental abnormalities resulting from localized ultraviolet irradiation of an amphibian egg. *J. Exp. Zool.* 189:249-254.
- Malacinski, G.M., H. Benford and H.M. Chung, 1975. Association of an ultraviolet irradiation sensitive cytoplasmic localization with the future dorsal side of the amphibian egg. *J. Exp. Zool.* 191:97-110.
- Malacinski, G.M., A.J. Brothers and H.M. Chung, 1977. Destruction of components of the neural induction system of the amphibian egg with ultraviolet irradiation. *Develop. Biol.* 56:24-39.
- Malacinski, G.M. and H.M. Chung, 1981. Establishment of the site of involution at novel location on the amphibian embryo. *J. Morphol.* 169:149-159.
- Malacinski, G.M., H.M. Chung and M. Asashima, 1980. The association of primary embryonic organizer activity with the future dorsal side of amphibian egg and early embryos. *Develop. Biol.* 77:449-462.
- Malacinski, G.M., H.M. Chung and B. Youn, 1978. Further characterization of the effects of ultra-

violet irradiation of the amphibian egg. *Experimentia* 34:883-884.

- Nieuwkoop, P.D., 1969. The formation of mesoderm in urodelean amphibians. II. The origin of the dorso-ventral polarity of the mesoderm. *Wilhelm Roux' Arch.* 163:298-315.
- Palecek, J., G.A. Ubbels and K. Rzehak, 1979. Changes of the external and internal pigment pattern upon fertilization in the egg of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 45:203-214.
- Pasteels, J., 1938. Recherches sur les facteurs initiaux de la morphogenese chez les amphibiens anoures. I. Resultants de l'experience de schultze et leur interpretation. *Arch. Biol.* 49:629-667.
- Spemann, H., 1938. Embryonic development and induction. Yale University Press, New Haven, Conn. (reprinted in 1967 by Hafner, New York).
- Steinberg, M. 1957 Carnegie Institute Washington Year Book 56, p.347 (reported by J.D. Ebert).
- Tompkins, R. and W.P. Rodman, 1971. The cortex of *Xenopus laevis* embryos: Regional differences in composition and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2921-2923.
- Weyer, C.J., P.D. Nieuwkoop and A. Lindenmayer, 1978. A diffusion model for mesoderm induction in amphibian embryos. *Acta Biotheoret.* 26:164-180.