

초기계배 발생에 미치는 Serotonin의 영향에 관한 세포생물학적 연구

최임순 · 주충노* · 최준근 · 주상옥 · 김재원*

(연세대학교 이과대학 생물학과; *연세대학교 이과대학 생화학과)

Cell Biological Studies of the Effect of Serotonin on Chick Embryogenesis

Rim Soon Choe, Chung No Joo*, Choon Keun Choi, Sang Ok Joo and Jae Won Kim*

(Department of Biology, Yonsei University;

*Department of Biochemistry, Yonsei University)

(1987. 8. 5. 접수)

ABSTRACT

Very early stage of chick embryo cultivated in the medium containing DL-tryptophan by beaker method has been investigated in vitro morphologically using electron microscopy at cellular level and found that the development of tryptophan treated chick embryos corresponding to 18~66 hrs incubation was impaired and yolk granule degradation was significantly delayed.

It was also found that DNA, RNA and protein biosynthesis of tryptophan treated chick embryo was greatly lowered than those of control group.

Conversion of L-tryptophan into serotonin was traced using ¹⁴C-L-tryptophan and found that 13.8% of added radioactivity was recovered from serotonin formed during 18 hrs incubation and the amounts of serotonin formed were depend upon added amount of tryptophan in egg yolk.

It seemed that the serotonin formed from external tryptophan might inhibit the degradation of yolk granule by feedback mechanism, resulting in malformation of chick embryogenesis.

서 론

Serotonin(5-hydroxytryptamine)은 신경전달물질로서 생리작용뿐 아니라 동물의 장크롬친화성세포(enterochromaffine cell)나 혈소판의 성분이며 최근에는 포유류 또는 비포유류의 배에서도 존재하며 형태가 분명치 않은 초기 배에서도 발견되며 주목을 끌고 있는 물질이다.

Emanuelsson(1976)은 초기 계배에서의 serotonin의 함량변화를 형광법으로 측정하고

본 연구는 1986년도 문교부 특성화 연구비로 이루어진 것임.

serotonin에 원시선조생성, 신경계생성, 체절형성등과 밀접한 관계가 있다고 주장하고 serotonin이나 serotonin 합성을 억제(diethylthiocarbamate) 또는 serotonin 기능을 방해(Catron, 5-methyltryptamine, promethazine)하는 물질을 계배에 가하면 배반엽확장, 초기선조생성, 뇌형성과 관련한 신경계형성, 체절형성에 기형이 나타난다고 보고하였다. 그들은 serotonin을 계배에 투여하면 난황과립의 분해가 저해됨을 관찰하고 serotonin이나 serotonin의 합성 또는 기능을 방해하는 물질을 가하면 세포내에서 serotonin을 생성하게 되는 난황과립 분해계가 저해된다고 해석하고 serotonin이나 serotonin 합성억제제 또는 기능 방해제로 인한 계배의 기형현상은 난황과립 분해의 지연으로 인하여 미세선모의 형성과 기능이 저해되어 배세포의 형태형성 능력이 저하되기 때문이라고 주장하였다. 그리고 serotonin은 주로 미소관과 미세섬유의 활성을 촉진한다고 제안하였다.

한편 Emanuelsson과 Palén(1975), 그리고 최등(1985, 1986)은 계배에 L-tryptophan을 투여하면 뇌형성과 체절형성이 저해됨을 관찰하고 tryptophan 투여로 인한 계배의 기형현상이 L-tryptophan으로 인한 당신생반응 억제(Ray 등, 1966)에도 원인이 있겠으나 L-tryptophan이 serotonin으로 전환되며 생성된 serotonin으로 인한 난황과립 분해의 지연이 주요 원인일 것으로 해석하고 있다. 실제로 계배 발생시의 형태변화는 세포내의 난황과립의 순차적 분해에 따라 조절된다는 것이 알려져 있으며 난황과립 분해에 따라 serotonin이 방출되고 방출된 serotonin의 양이 과립 분해를 조절한다는 것이다(Palén *et al.*, 1979).

본 연구에서는 위에서 논의한 serotonin의 초기 발생에서의 작용에 대한 실험적 증거를 제시하기 위해 L-tryptophan을 함유한 배지에서 배양한 초기 계배의 형태(세포수준) 변화를 전자현미경으로 관찰하고 초기 계배에서의 tryptophan의 serotonin으로의 변화, DNA, RNA, 단백질합성을 방사성 ^{14}C 또는 ^3H 로 표지된 기질을 이용하여 관찰하여 정상배지에서 배양한 배와 비교 검토하였다.

재료 및 방법

(1) 실험 재료

수정난($70 \pm 5\text{g}$)은 서울 공농동 소재, 천호부화장에서 구입한 MANIKER 육계 종란을 사용하였다. DL-tryptophan은 Junsei사 제품, Na-monohydrogen phosphate, K-dihydrogen phosphate, serotonin(creatine sulfate form)은 Sigma사 제품, L-[methylene- ^{14}C]-tryptophan은 Amersham사 제품, L-[^{14}C (U)]-leucine, [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-thymidine, [$6\text{-}^3\text{H}$]-uridine은 New England Nuclear사 제품을 사용하였다.

(2) 수정난의 발생

수정난은 원시선조(primitive streak) 단계가 될 때까지 $37.5^\circ\text{C} \pm 0.5$ 에서 24시간 배양한 후, 비이커 방법(Palén *et al.*, 1975)으로 DL-tryptophan(3mg/ml medium)이 함유된 배지와 saline만을 함유한 배지를 이용하여 CO_2 부란기(상대습도: 60%, $37.5^\circ\text{C} \pm 0.5$)에서 18시간, 24시간, 48시간, 66시간 배양하였다. 배양액의 조성은 PbS saline[NaCl 8g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 1.15g, KH_2PO_4 0.2g, CaCl_2 0.1g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/l]과 egg albumin의 비율이 45:55가 되도록 하였다.

(3) 전자현미경 표본처리

전자현미경 표본은 18시간, 24시간, 48시간, 66시간 배양한 수정난으로부터 전 배반엽(whole blastoderm)을 적출하여, 2.5% glutaraldehyde로 고정된 후 같은 buffer로 세척하고 0.1M phosphate buffer로 조정된 OsO_4 에서 2시간동안 고정하였다. 고정된 시료의 탈수는 에탄올의 농도상승순으로 탈수하고, 최종적으로 propylene oxide를 사용하여 치환한 다음, epoxy resin으로 포매하였다. 유리칼을 사용하여 sorvall MT_2 -B형 초박절편기로 thick section 하고, 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 후 50~60nm의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색후 투과전자현미경(Hitachi-500)으로 관찰하였다.

(4) RNA 및 DNA의 합성

미이커법으로 각각 18시간, 24시간, 48시간, 66시간 배양한 계배를 0.25mM sucrose-10mM Tris buffer(pH 7.4)를 사용하여 균질화(50% 균질액)한 후 ^3H -uridine(21, 977cpm)과 ^{14}C -thymidine(38, 466cpm)을 가하고, 37°C에서 1시간 방치한 후 trichloroacetic acid(TCA) 3ml을 가하여 반응을 정지시키고 원심분리(3,000g, 20min)하여 침전물을 얻은 다음 TCA 용액으로 2회 세척하였다. Chloroform-methanol 혼합액(2:1, v/v) 3ml을 가하여 지질을 제거하는 과정을 2회 되풀이한 후 원심분리하여 얻은 침전물에 TCA 2ml을 가하고 90°C에서 20min간 가열한 다음 원심분리하여 상층액을 얻고 이것을 TCA 용액으로 세척하고, 상층액을 모아 ^3H 과 ^{14}C 의 방사능을 측정하여 합성된 RNA와 DNA양을 추적하였다.

(5) 단백질의 합성

위와 같은 방법으로 얻은 계배에 ^{14}C -leucine(66, 500cpm)을 가하고, 37°C에서 1시간 방치한 후 TCA 3ml을 가하여 반응을 정지시키고, 원심분리(3,000g, 20min)하여 침전물을 얻은 다음 TCA 용액으로 2회 세척하였다. 90% methanol 3ml을 가하여 원심분리하여 얻은 침전물에 petroleum ether 2ml을 가하여 지질은 제거하는 과정을 5회 되풀이한 후 원심분리하여 얻은 침전물의 방사능을 측정하였다.

(6) Tryptophan의 serotonin으로의 전환

수정난을 37°C에서 24시간 preincubation한 후, 난황 2ml을 취하여 $\text{L-}^{14}\text{C}$ -tryptophan(137, 800cpm)을 DL-tryptophan(50 μg)과 함께 첨가한 group I과 $\text{L-}^{14}\text{C}$ -tryptophan만을 가한 group II를 37°C에서 1시간, 18시간, 66시간, 90시간 반응시킨 후, Udenfriend(1955)의 방법에 따라 serotonin을 추출하여 paper chromatography(isopropanol-ammonia-water, 200:10:20, v/v/v)방법 (Smith, 1958)으로 확인한 후 해당부분의 방사능을 측정하였다(Azmita, 1970).

결 과

정상군과 tryptophan 투여군(시험군)을 18시간, 24시간, 48시간, 66시간 미이커 방법으로 *in vitro*에서 배양한 후 적출한 배반엽의 전자현미경 관찰 결과는 각각 그림 1-8과 표 1과 같다.

18시간 배양한 계배(정상군) 배반엽의 세포질은 미숙하였고, 미토콘드리아, 조면소포체, 소포, 공포, 지방질 등을 관찰할 수 있었으며 난황과립(yolk granule)이 산재되어 있음이 관찰되었다(Fig. 1). 그러나 tryptophan을 투여한 경우에는 정상군에 비해 세포질이 더욱

Table 1. Electron microscopic observation of the effect of tryptophan on chick embryogenesis (cell level)

(1) 18 hr incubation

| | Normal group | | | | | Tryptophan treated group | | | | |
|-----------------------------|--------------|---|---|----|---|--------------------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Cytoplasm scanty | + | + | + | + | + | †† | + | + | †† | + |
| Mitochondria | + | + | — | + | — | †† | + | + | †† | + |
| Rough endoplasmic reticulum | + | — | + | — | — | †† | + | + | †† | + |
| Lipid droplet | †† | + | + | + | + | †† | †† | †† | †† | †† |
| Vesicle | + | + | + | + | + | †† | + | †† | + | + |
| Vacuole | + | + | + | + | + | †† | + | †† | + | †† |
| Yolk granule | †† | + | + | †† | + | †† | †† | †† | †† | + |
| Lysosome | + | + | + | + | + | + | + | + | †† | + |

(2) 24 hr incubation

| | Normal group | | | | | Tryptophan treated group | | | | |
|-----------------------------|--------------|---|---|---|---|--------------------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Cytoplasm scanty | + | + | + | + | + | †† | + | †† | + | + |
| Mitochondria | + | — | + | — | — | †† | †† | †† | + | + |
| Rough endoplasmic reticulum | + | — | + | — | + | †† | †† | †† | + | + |
| Lipid droplet | + | + | + | + | + | †† | + | †† | + | †† |
| Vesicle | †† | + | + | + | + | †† | †† | †† | †† | †† |
| Vacuole | †† | + | + | + | + | †† | †† | †† | †† | †† |
| Yolk granule | †† | + | + | + | + | †† | †† | + | †† | + |
| Lysosome | + | + | — | — | — | + | — | + | — | — |

(3) 48 hr incubation

| | Normal group | | | | | Tryptophan treated group | | | | |
|-----------------------------|--------------|---|---|---|---|--------------------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Cytoplasm scanty | — | + | — | — | — | + | — | + | + | — |
| Mitochondria | — | + | — | — | — | + | + | †† | + | + |
| Rough endoplasmic reticulum | — | + | — | — | — | + | + | †† | + | + |
| Lipid droplet | — | + | — | + | — | †† | + | †† | + | †† |
| Vesicle | — | + | — | + | — | †† | + | †† | †† | †† |
| Vacuole | + | + | + | + | + | †† | †† | †† | †† | †† |
| Yolk granule | + | — | — | — | — | + | + | — | + | — |
| Lysosome | + | — | — | — | — | + | + | — | — | — |

(4) 66 hr incubation

| | Normal group | | | | | Tryptophan treated group | | | | |
|-----------------------------|--------------|---|---|---|---|--------------------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Cytoplasm scant | - | + | - | - | - | + | - | + | - | + |
| Mitochondria | - | + | - | - | - | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| Rough endoplasmic reticulum | - | + | - | + | - | + | ++ | + | ++ | ++ |
| Lipid droplet | + | + | - | - | - | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Vesicle | + | + | - | - | + | ++ | ++ | + | ++ | + |
| Vacuole | + | + | - | - | + | ++ | + | ++ | + | + |
| Yolk granule | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Lysosome | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - |

미속하였고, 미토콘드리아와 조면소포체는 확장되었으며 세포질에 많은 공포와 작은 기름방울, 소포 등이 관찰되었고, 난황과립이 많으며 그의 크기도 큰 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

24시간 배양한 정상군의 배반엽은 18시간에 비하여 세포질이 조금 많아졌을 뿐 큰 차이는 없었으나(Fig. 3), tryptophan 투여군은 정상군에 비하여 세포질이 미속하였고, 미토콘드리아와 조면소포체가 약간 확장되었으며 과립감소된 폴리솜이 많았다. 또한 리소솜이 많이 나타나고 있었으며, 세포질내에 소포, 공포, 작은 기름방울 등이 많았고 난황과립도 정상군에 비하여 많이 분포되어 있었으나 18시간째의 시험군보다는 감소된 것으로 나타났다(Fig. 4).

48시간 배양한 정상군의 배반엽은 24시간의 배반엽에 비하여 세포질이 훨씬 많아졌다. 즉, 뚜렷한 핵막과 인이 보이고, 크리스테가 분명한 미토콘드리아와 핵막과 연결된 조면소포체가 보였으며, 난황과립이나 작은 기름방울, 공포 등은 현저하게 감소된 것으로 나타났다(Fig. 5).

48시간 배양한 시험군의 배반엽은 정상군에 비하여 세포질이 미속하였고, 미토콘드리아는 크리스테가 확장되어 있었으며, 지방질, 공포, 소포 등이 많았고, myelin figure 등도 나타났다(Fig. 6).

66시간 배양한 정상군의 배반엽에서는 많은 세포들을 볼 수 있었으며, 세포질도 잘 발달되어 있었다. 핵막은 약간 불규칙한 형태를 하고 있으며, 비교적 크리스테가 뚜렷한 미토

Table 2. Effect of tryptophan on DNA synthesis of the early chick embryo. The values are the mean of three determinations. The figures in bracket are % of control.

| Incubation time(hrs) | Radioactivity of ¹⁴ C-Thymidine incorporated into DNA(cpm) | |
|----------------------|---|-----------|
| | Control | Test |
| 18 hrs | 2,240(100) | 1,783(80) |
| 24 hrs | 1,873(100) | 1,608(86) |
| 48 hrs | 1,763(100) | 1,605(91) |
| 66 hrs | 1,571(100) | 1,338(85) |

Control group was cultivated in the PBS and egg albumin.

Test group was cultivated in the PBS and egg albumin containing tryptophan.

Table 3. Effect of tryptophan on RNA synthesis of the early chick embryo. The values are the mean of three determinations. The figures in bracket are % of control.

| Incubation time(hrs) | Radioactivity of ¹⁴ C-Uridine incorporated into RNA(cpm) | |
|----------------------|---|-----------|
| | Control | Test |
| 18 hrs | 2,281(100) | 1,889(83) |
| 24 hrs | 1,812(100) | 1,471(82) |
| 48 hrs | 1,815(100) | 1,596(86) |
| 66 hrs | 1,297(100) | 1,085(84) |

Control group was cultivated in the PBS and egg albumin.

Test group was cultivated in the PBS and egg albumin containing tryptophan.

Table 4. Effect of tryptophan on protein synthesis of the early chick embryo. The values are the mean of three determinations. The figures in bracket are % of control.

| Incubation time(hrs) | Radioactivity of ¹⁴ C-Leucine incorporated into protein(cpm) | |
|----------------------|---|-----------|
| | Control | Test |
| 18 hrs | 3,281(100) | 3,126(95) |
| 24 hrs | 2,348(100) | 2,033(87) |
| 48 hrs | 2,992(100) | 2,469(83) |
| 66 hrs | 1,788(100) | 1,462(82) |

Control group was cultivated in the PBS and egg albumin.

Test group was cultivated in the PBS and egg albumin containing tryptophan.

콘드리아를 볼 수 있었으며, 조면수포체, 작은 기름방울, 소포 등이 관찰되었다(Fig. 7).

66시간 배양한 시험군의 배반엽은 정상군에 비하여 핵막이 분명하지 않았고, pyknosis를 일으킨 것도 있었으며, 미토콘드리아는 크리스테가 불분명하거나 확장되어 있었다. 또한 정상군에 비하여 세포질이 미숙하였으며, 비교적 커다란 기름방울, 공포 등이 많이 관찰되었다(Fig. 8).

초기 계배의 DNA, RNA 합성능을 시간별로 조사한 결과, tryptophan을 투여한 경우 표 3, 표 4에 표시된 바와 같이 DNA, RNA 합성이 모두 정상군에 비하여 약 15~20% 정도 저하되었음을 확인하였다. 또한 초기 계배의 단백질 합성능을 조사한 결과도 tryptophan을 처리할 경우 정상군보다 크게 저하(약 20%)되고 있음을 관찰할 수 있었다(Table 5).

37.5°C±0.5에서 24시간 preincubation한 난황을 사용하여 L-¹⁴C-tryptophan을 이용하여 tryptophan의 serotonin으로의 전환을 in vitro에서 관찰한 결과, 가해준 방사능이 1시간 후에는 8.2%, 18시간후에는 13.8%가 serotonin에서 회수되었다.

한편 난황에 cold tryptophan(DL-tryptophan, 50μg)을 가한 후 L-¹⁴C-tryptophan을 가하여 serotonin에서 회수된 방사능을 조사한 결과 1시간후에는 6.7%, 18시간후에는 7.8%로서 cold tryptophan을 가하지 않은 경우보다 회수율은 약간 낮았으나 가해준 DL-tryptophan의 양을 고려할 때 실제로 생성된 serotonin의 양은 훨씬 많은 것으로 예측된다. 즉, 난황에서의 tryptophan→serotonin 전환은 가해준 tryptophan의 양에 의존함을 알 수 있다. 그러나 난황을 장시간(66시간, 90시간) 배양했을 때는 가해준 방사능의 serotonin에서의 회수율

Table 5. In vitro conversion of ^{14}C -tryptophan into ^{14}C -serotonin in egg yolk.

| Group | I | | II | |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | Radioactivity in serotonin(cpm) | % recovered in serotonin | Radioactivity in serotonin(cpm) | % recovered in serotonin |
| Incubation time | | | | |
| 1 hr | 9,190 | 6.7 | 11,286 | 8.2 |
| 18 hr | 10,706 | 7.8 | 18,991 | 13.8 |
| 48 hr | 3,783 | 2.7 | 3,633 | 2.6 |
| 66 hr | 4,810 | 3.5 | 5,140 | 3.7 |

I. L- ^{14}C -tryptophan and DL-tryptophan added group

II. L- ^{14}C -tryptophan added group

은 DL-tryptophan을 가한 군이나 가하지 않은 군이나 모두 낮았으며, 생성된 serotonin이 분해되거나 다른 물질로 전환했을 것으로 예상되나 확실치는 않다.

고 찰

Emanuelsson과 Palén(1975)은 초기 계배에 L-tryptophan을 투여하였을 때 뇌와체질형성에 기형현상이 일어남을 관찰하였고, 난황에 투여한 L-tryptophan이 serotonin으로 되어 결과적으로 난황과립의 분해가 억제된다고 주장하였다. 왜냐하면 형태형성이 세포내의 난황과립의 규칙적 분해에 의해 조절되고 난황분해시 방출되는 serotonin의 영향을 받기 때문이다. Serotonin과 serotonin 생성을 방해하는 물질을 투여하면 난황과립의 분해가 지연되어 microvilli의 생성과 기능이 저해되고 배세포의 정상 발달이 저해된다는 것이 알려져 있고, 또 serotonin은 미소관과 미세섬유의 활성을 일차적으로 촉진한다는 증거도 있다(Palén *et al.*, 1979). 난황과립은 tryptophan뿐 아니라 phenylalanine, tyrosine과 같은 방향족 아미노산을 다량 함유하고 있어 L-phenylalanine을 투여한 경우에도 L-tryptophan 투여시와 같은 somite block 형성과 기형현상이 일어난다고 알려져 있다(Palén *et al.*, 1981).

본 연구에서도 phenylalanine, tryptophan, tyrosine과 같은 방향족 아미노산을 계배발생 초기에 투여하면 somite의 발생이 불완전하고, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase, glucose 6-phosphate dehydrogenase와 같은 기초대사에 중요한 효소들의 활성이 저하됨이 관찰되었고(Choe *et al.*, 1985), tryptophan을 투여하였을 때 초기 계배의 뇌형성이 크게 손상되고, RNA, 단백질합성이 저하되며, serotonin의 함량이 tryptophan 투여군의 경우 정상군보다 훨씬 높다는 것이 관찰되었다(Choe *et al.*, 1986).

본 연구에서 기도한 비이커 방법으로 배양한 초기 계배의 전자현미경 사진을 보면, tryptophan 처리군이 정상군에 비하여 배반엽의 세포질이 미숙하고, 미토콘드리아, 조면소포체가 확장되었으며, 세포질에 많은 공포와 작은 기름방울, 소포 등이 관찰되었고, 난황과립의 분해가 지연되고 있음이 관찰되었다.

또한 tryptophan 처리군의 18~66시간 배양 해당계배의 DNA, RNA, 단백질 합성능이 정상군에 비하여 15~20% 저하되고 있었다. 또 L- ^{14}C -tryptophan을 이용하여 난황에서의 tryptophan의 serotonin으로의 전환을 실험한 결과에서도 가해준 tryptophan의 10% 이상이 serotonin으로 전환되었으며, serotonin의 생성은 가해준 tryptophan양에 의존함을 알 수 있

었다.

이와 같은 실험결과는 tryptophan 투여가 난황과립의 분해를 지연시켜 결과적으로 정상대사를 방해하여 기형현상을 초래한다는 주장을 뒷받침하는 것으로 생각된다.

적 요

수정난을 tryptophan을 함유한 배양액에서 비이커 방법으로 배양한 초기 계배의 형태를 세포수준에서 전자현미경으로 관찰하면, 배반엽의 세포질이나 조면소포체, 미토콘드리아가 정상군에 비하여 미숙하고, 난황과립의 분해가 정상군에 비하여 지연되고 있음을 알 수가 있다.

또 tryptophan 처리 계배의 DNA, RNA, 단백질 합성이 정상 계배에 비하여 크게 저하되고 있음이 방사성 기질을 사용한 실험에서 확인되었다.

한편 난황을 사용하여 ^{14}C 으로 표지된 L-tryptophan의 serotonin으로의 전환을 조사한 결과, 배양시간이 18시간인 경우 가해진 방사능의 13.8%가 serotonin에서 회수되었으며, 가해진 tryptophan의 양에 따라 생성된 serotonin의 양이 많았다. 그러나 배양시간이 길면 serotonin에서 회수되는 방사능의 수율이 크게 감소되는 것으로 보아 serotonin이 쉽게 변형되는 것으로 생각된다.

위와 같은 실험결과는 투여한 tryptophan이 serotonin으로 전환되어 serotonin의 증가로 인하여 세포내 난황과립의 분해가 feed back1억제로 지연됨으로서 정상적 계배발생에 기형이 초래되는 것으로 생각된다.

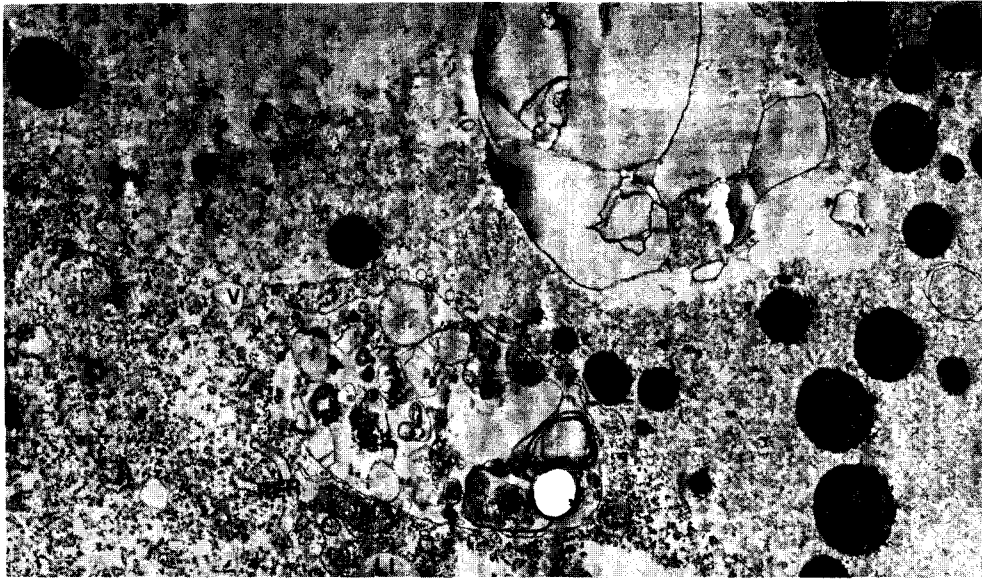
REFERENCES

- Azmita, E.C., S. Algeri and E. Costa, 1970, *In vivo* conversion of ^3H -L-tryptophan into ^3H -serotonin in brain adrenalectomized rats. *Science* **166**, 201-203.
- Choe, R.S., C.N. Joo, C.K. Choi and J.W. Kim, 1985, Cell biological studies of the effect of aromatic amino acids on early development of chick embryo. *Korean J. of Zool.* **38**(4), 257-273.
- Choe, R.S., C.N. Joo, C.K. Choi, J.W. Kim and S.O. Joo, 1986, Cell biological studies on brain formation at the early stage of chick embryogenesis. *Korean J. of Zool.* **29**(3), 215-233.
- Emanuelsson, H. and K. Palén, 1975, Effects of L-tryptophan on morphogenesis and growth in the early chick blastoderm. *Wilhelm Roux' Arch. Devl. Biol.* **177**, 1-17.
- Palén, K. and Thöneby, 1981, Effects of L-phenylalanine on somite formation in the early chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* **161**, 175-190.
- Palén, K., L. Thöneby and Emanuelsson, 1979, Effects of serotonin and serotonin antagonists on chick embryogenesis. *Wilhelm Roux' Arch. Devl. Biol.* **187**, 89-103.
- Ray, P.D., D.O. Foster and H.A. Lardy, 1966, Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. *J. Biol. Chem.* **241**, 3904-3908.

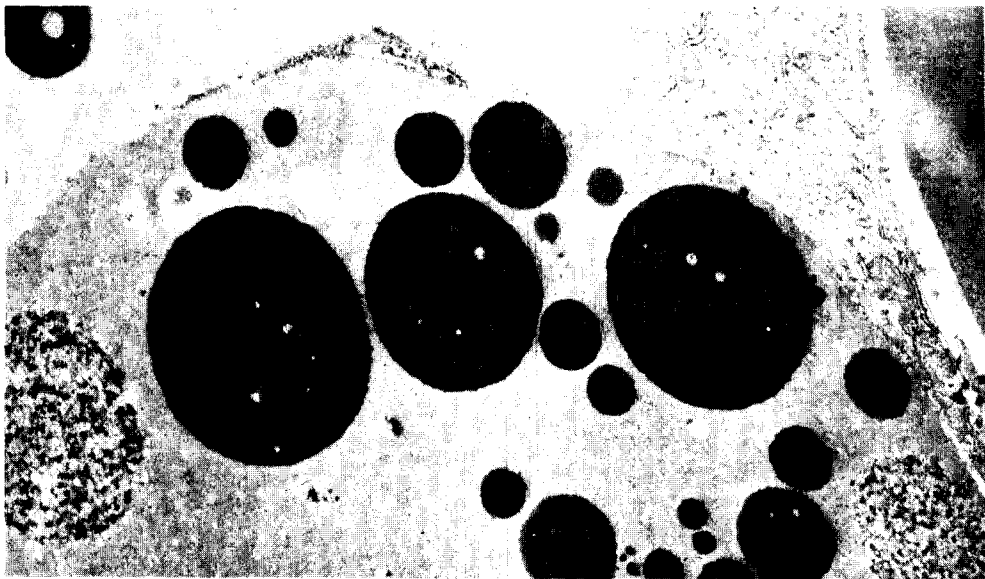
FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrograph of blastoderm of normal chick embryo (18 hr)
Fig. 2. Electron micrograph of blastoderm of tryptophan treated chick embryo (18 hr)
Fig. 3. Electron micrograph of blastoderm of normal chick embryo (24 hr)
Fig. 4. Electron micrograph of blastoderm of tyrtophan treated chick embryo (24 hr)
Fig. 5. Electron micrograph of blastoderm of normal chick embryo (48 hr)
Fig. 6. Electron micrograph of blastoderm of tryptophan treated chick embryo (48 hr)
Fig. 7. Electron micrograph of blastoderm of normal chick embryo (66 hr)
Fig. 8. Electron micrograph of blastoderm of tyrptophan treated chick embryo (66 hr)
Fig. 1-8. ($\times 10,000$)

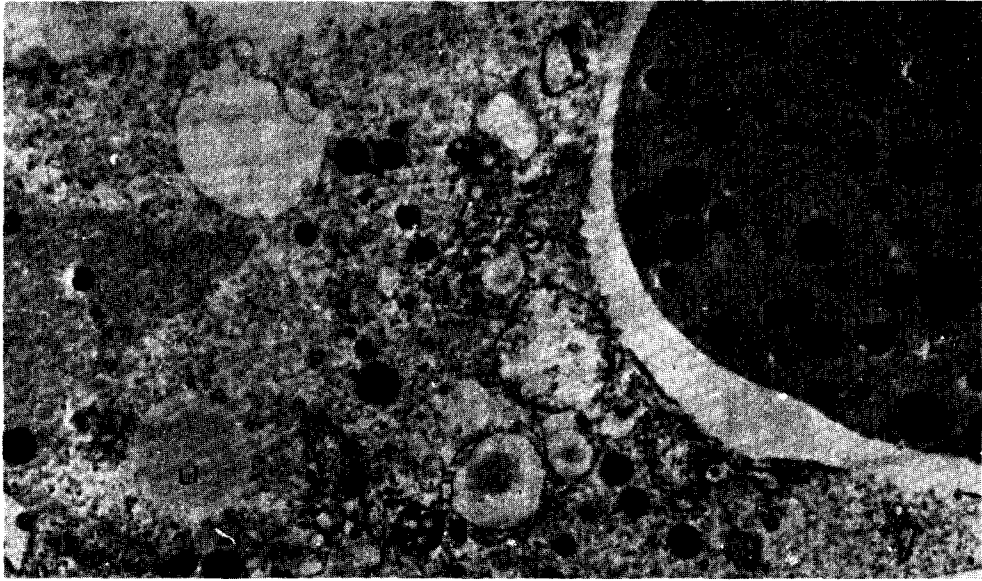
Abbreviation: N=Nucleus, No=Nucleolus, M=Mitochondria, RER=Rough endoplasmic reticulum,
L=Lysosome, V=Vesicle, LI=Lipid droplet, YG=Yolk granule.



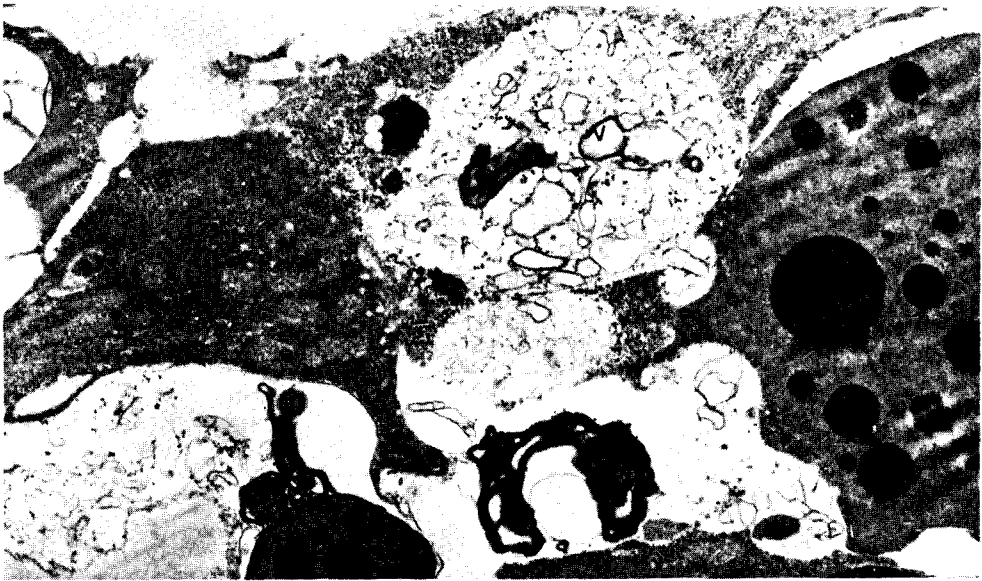
1



2



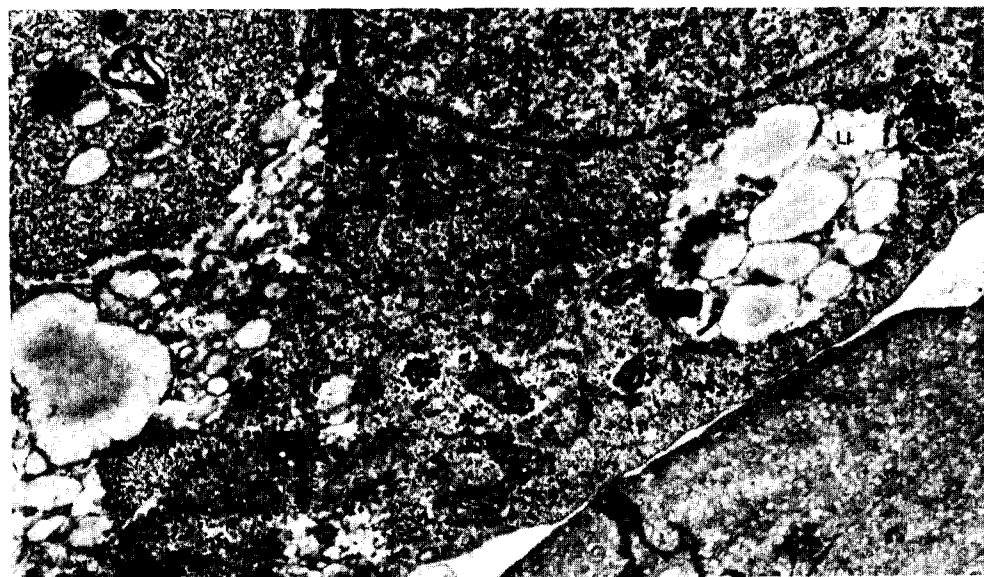
3



4



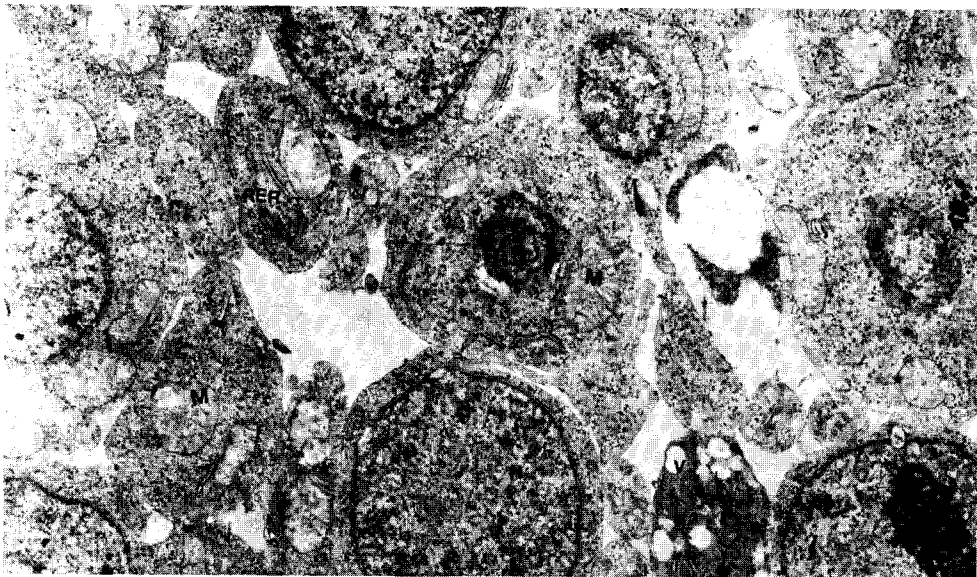
5



6



7



8

Table 1. Collection localities, date and sample size of *Elaphe dione*.

| locality | sample size | coll. date |
|---------------------------------|-------------|---------------|
| 1. Kosung, Kangwon-do | 20 | May 27, 1983 |
| 2. Chunchon, Kangwon-do | 20 | June 2, 1983 |
| 3. Kangrung, Kangwon-do | 20 | May 20, 1983 |
| 4. Mt. Kyeyang, Kyonggi-do | 20 | Aug. 15, 1983 |
| 5. Daegi-ri, Kangwon-do | 20 | May 25, 1983 |
| 6. Mt. Sogri, Chungchongbug-do | 19 | June 10, 1983 |
| 7. Mt. Doggyu, Chollabug-do | 19 | July 3, 1983 |
| 8. Mt. Chiri, Chollanam-do | 19 | July 17, 1983 |
| 9. Pusan | 18 | July 22, 1983 |
| 10. Koche Isl., Kyongsangnam-do | 18 | July 20, 1983 |
| 11. Chin Isl., Chollanam-do | 20 | July 15, 1983 |
| 12. Chechu, Chechu-do | 19 | July 29, 1983 |
| Total | 232 | |

Table 2. Buffer systems and enzymes used in the electrophoretic analysis.

| buffer | enzyme | voltage & time(hr) | |
|--|---|--------------------|---|
| continuous tris-citrate II (TC II, pH:8.0) | malate dehydrogenase (<i>Mdh-1,2</i>) | 100 | 3 |
| | isocitrate dehydrogenase (<i>Idh-1,2</i>) | | |
| | glutamic oxaloacetate transaminase (<i>Got-1,2</i>) | | |
| | phosphoglucomutase (<i>Pgm</i>) | | |
| | phosphoglucoisomerase (<i>Pgi</i>) | | |
| discontinuous tris-citrate (Poulik, pH:8.2) | lactate dehydrogenase (<i>Ldh-1,2</i>) | 250 | 3 |
| | alcohol dehydrogenase (<i>Adh</i>) | | |
| | mannose phosphate isomerase (<i>Mpi</i>) | | |
| | peptidase (<i>Pept</i>) | | |
| lithium hydroxide (LiOH, pH:8.1) | aconitase (<i>Aco-3</i>) | 300 | 3 |
| | esterase (<i>Est-2</i>) | | |
| | general protein (<i>Gp</i>) | | |
| tris maleate(TM, pH:7.4) | 6 phosphogluconate dehydrogenase (<i>6Pgd</i>) | 100 | 4 |

電氣泳動은 Selander 등(1971) 및 Paik 등(1979)의 方法에 따라 horizontal starch gel electrophoresis를 實施하였으며 gel은 sigma starch(S-4501)로 濃度는 11.3%였다. 電氣泳動 條件 및 方法은 Table 2와 같다.

電氣泳動 후 얻어진 各 酵素 및 蛋白質의 isozyme pattern을 土臺로 하여 個體別로 genotype을 求하고 遺傳子頻度, 多型形 頻度(% polymorphism, P) 및 異型接合子頻度(heterozygosity, H) (Selander, 1976)를 算出하여 集團間 遺傳的 變異程度를 比較하였고 各 集團의 遺傳子頻度를 根據로 하여 Rogers' genetic similarity coefficients (Rogers, 1972) 값을 求하

이 集團間 遺傳的 近緣關係를 究明하고 Sneath and Sokal(1973)의 UPGMA 값을 Bio-Sys program으로 電算處理하여 dendrogram을 作成 比較하였다.

結果 및 考察

南韓一帶 12個 地域에서 採集된 標本 總 232個體를 電氣泳動한 結果 13個의 酵素 및 蛋白質에서 17個의 遺傳子를 檢出하였다. 이들중 *Mdh-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Idh-1*, *Ith-2*, *Adh*, *Aco-3*, *Gp* 및 *Got-1*의 9個 遺傳子 (53%)는 全 集團 共히 monomorphic하였다 나머지 8個의 遺傳子(47%)는 集團에 따라 變異가 있었으며 이들 各 遺傳子의 頻度는 Table 3과 같다.

8個의 遺傳子 중 *Pgm*, *Mpi*, *Pept-1* 및 *Got-2*의 4個 遺傳子는 變異 程度가 매우 낮았고 *Pgm^d*對立因子는 濟州道集團에서만 發見되었으며 그 頻度는 0.026이었다. *Mdh-1*, *Pgi*, *Est-2* 및 *6Pgd*의 4個 遺傳子는 變異 程度가 높은 편으로 大部分의 集團에서 2~3個의 對立

Table 3. Allele frequencies of 8 polymorphic loci in 12 populations of *Elaphe dione* (locality numbers refer to table 1).

| loci | alleles | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>Mdh-1</i> | a | 0.98 | 0.85 | 0.88 | 0.93 | 0.93 | 0.79 | 0.92 | 0.90 | 0.97 | 0.94 | 0.90 | 0.34 |
| | b | 0.02 | 0.15 | 0.12 | 0.07 | 0.07 | 0.21 | 0.08 | 0.10 | 0.03 | 0.06 | 0.10 | 0.66 |
| <i>Pgm</i> | a | — | 0.05 | — | — | — | — | 0.03 | — | — | — | — | — |
| | b | 0.95 | 0.95 | 1.00 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.92 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.97 |
| | c | 0.05 | — | — | 0.02 | — | — | 0.05 | — | — | — | — | — |
| | d | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0.03 |
| <i>Pgi</i> | a | 0.03 | 0.02 | — | 0.05 | — | 0.05 | 0.08 | 0.05 | 0.11 | 0.19 | 0.07 | — |
| | b | — | — | — | — | 0.05 | — | — | — | 0.06 | — | — | — |
| | c | 0.94 | 0.98 | 0.98 | 0.95 | 0.93 | 0.95 | 0.92 | 0.95 | 0.83 | 0.81 | 0.93 | 0.84 |
| | d | 0.03 | — | 0.02 | — | 0.02 | — | — | — | — | — | — | 0.16 |
| <i>Mpi</i> | a | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.97 | 0.92 | 1.00 | 0.97 | 0.95 | 1.00 |
| | b | — | — | — | — | — | — | 0.03 | 0.08 | — | 0.03 | 0.05 | — |
| <i>Pept-1</i> | a | — | 0.10 | — | 0.10 | 0.05 | 0.08 | — | — | — | — | — | 0.11 |
| | b | 1.00 | 0.88 | 1.00 | 0.83 | 0.90 | 0.92 | 1.00 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.78 |
| | c | — | 0.02 | — | 0.07 | 0.05 | — | — | 0.03 | — | — | — | 0.11 |
| <i>Est-2</i> | a | 0.18 | 0.10 | 0.20 | — | 0.23 | 0.05 | — | 0.05 | 0.05 | 0.08 | 0.08 | 0.03 |
| | b | 0.02 | — | — | — | 0.02 | 0.03 | — | — | 0.03 | — | 0.02 | — |
| | c | 0.80 | 0.90 | 0.80 | 1.00 | 0.75 | 0.92 | 1.00 | 0.95 | 0.92 | 0.92 | 0.90 | 0.97 |
| <i>Got-2</i> | a | 1.00 | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 0.98 | 0.92 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.97 |
| | b | — | 0.02 | 0.02 | — | 0.02 | 0.08 | 0.03 | — | — | — | — | 0.03 |
| <i>6Pgd</i> | a | — | 0.02 | — | 0.02 | — | — | 0.10 | 0.05 | 0.08 | 0.22 | 0.07 | — |
| | b | — | — | — | — | 0.02 | 0.03 | — | — | — | — | — | — |
| | c | 0.95 | 0.98 | 1.00 | 0.98 | 0.98 | 0.97 | 0.90 | 0.95 | 0.89 | 0.78 | 0.93 | 0.85 |
| | d | 0.05 | — | — | — | — | — | — | — | — | 0.03 | — | 0.15 |

Table 4. Mean number of alleles, polymorphism and heterozygosity in 12 populations of *Elaphe dione*.

| | population size (N) | mean No. of alleles | polymorphic loci | heterozygosity | |
|----------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------|----------------|
| | | | | H _G | H _D |
| 1. Kosung | 20 | 1.41 | 0.29 | 0.045 | 0.039 |
| 2. Chunchon | 20 | 1.47 | 0.41 | 0.053 | 0.058 |
| 3. Kangrung | 20 | 1.23 | 0.24 | 0.027 | 0.037 |
| 4. Mt. Kyeyang | 20 | 1.35 | 0.29 | 0.042 | 0.043 |
| 5. Daegi-ri | 20 | 1.56 | 0.38 | 0.066 | 0.066 |
| 6. Mt. Sogri | 19 | 1.41 | 0.35 | 0.050 | 0.046 |
| 7. Mt. Duggyu | 19 | 1.41 | 0.35 | 0.034 | 0.043 |
| 8. Mt. Chiri | 19 | 1.35 | 0.35 | 0.044 | 0.040 |
| 9. Pusan | 18 | 1.41 | 0.24 | 0.036 | 0.041 |
| 10. Koche Isl. | 18 | 1.29 | 0.29 | 0.050 | 0.057 |
| 11. Chin | 20 | 1.35 | 0.29 | 0.039 | 0.038 |
| 12. Chechu | 19 | 1.47 | 0.41 | 0.082 | 0.087 |
| average | 19 | 1.376 | 0.324 | 0.0473 | 0.0496 |

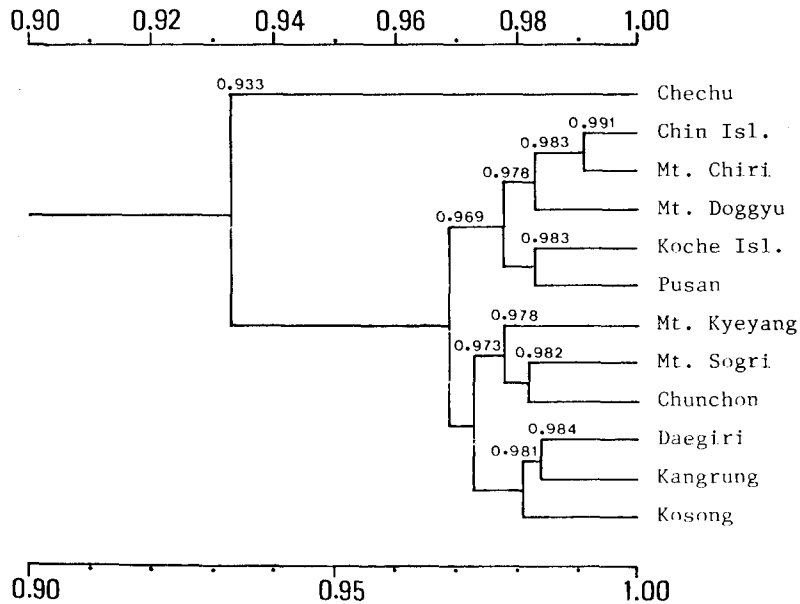
인자를 갖고 있었다.全體 17個 遺傳子 중 16個 遺傳子是 全 集團에서 80% 以上の 頻度로 dominant allele을 共有하였으나 濟州道集團은 *Mdh-1^b*의 頻도가 0.66으로 他集團의 *Mdh-1^a* 頻도가 80% 以上인 것과 현저한 差異를 나타내었다.

遺傳的變異 程度를 集團別로 調查하기 위하여 遺傳子 當 平均對立因子數(A), 多型形頻度(P), 異型接合子頻度(H)를 求한 結果는 Table 4와 같다. Table 4에서와 같이 遺傳子 當 平均 對立因子數는 江陵集團이 A=1.23으로 그 값이 가장 적었고 大基里集團이 A=1.56으로 가장 많았다.全體 平均 對立因子數는 $\bar{A}=1.38$ 로 참개구리(*Rana nigromaculata*)의 $\bar{A}=1.31$ 와 비슷한 값이었다(Yang, 1983). 多型形의 頻度는 濟州道 및 江陵集團이 P=0.41로서 가장 높은 반면 釜山集團은 P=0.24로서 가장 낮았으며 全 集團의 平均多型形頻度는 $\bar{P}=0.324$ 로 爬蟲類의 平均 $\bar{P}=0.231$ (Selander, 1976)과 韓國產 유휄목이(*Rhabdophis t. tigrina*)의 $\bar{P}=0.228$ 에 比하여 다소 높게 나타났다(白과 梁, 1986). 異型接合子頻度는 直接 觀察된 異型接合子頻度(H_D)와 遺傳子 頻도에 의한 豫測頻度(H_G)를 算出한 結果 平均 \bar{H} 값은 $\bar{H}_D=0.0496$, $\bar{H}_G=0.0473$ 으로 이들 사이에 有意한 差異는 없었으며 概 報告된 爬蟲類의 平均 $\bar{H}=0.047$ (Selander, 1976)의 값과 同一하였다. 調查한 12個 集團 중 江陵集團은 H_D=0.037, H_G=0.027로 그 값이 제일 낮은 반면 濟州道集團은 H_D=0.087, H_G=0.082로 그 값이 제일 높았다.

各 集團間의 遺傳的 近緣關係를 比較하기 위하여 Rogers(1972)의 遺傳的 近緣值를 求한 結果는 Table 5와 같다. Table 5에서 보는 바와 같이 12個 集團間 平均 遺傳的 近緣值는 $\bar{S}=0.966(0.924\sim 0.991)$ 로서 集團間 類似性이 매우 높았으며 이 값은 韓國產 유휄목이(*Rhabdophis t. tigrina*)의 集團間 遺傳的 近緣值와 거의 同一하였으며(白과 梁, 1986) 他動物群의 集團間 遺傳的 近緣值와도 類似하였다(Avise, 1976).

Table 5. Rogers' genetic similarity coefficients among 12 populations of *Elaphe dione*.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Kosung | | 0.972 | 0.984 | 0.972 | 0.978 | 0.968 | 0.954 | 0.974 | 0.979 | 0.966 | 0.977 | 0.925 |
| 2. Chuncheon | | | 0.980 | 0.981 | 0.976 | 0.982 | 0.936 | 0.976 | 0.968 | 0.959 | 0.976 | 0.941 |
| 3. Kangrung | | | | 0.969 | 0.984 | 0.976 | 0.970 | 0.977 | 0.971 | 0.962 | 0.979 | 0.929 |
| 4. Mt. Kyeyang | | | | | 0.977 | 0.975 | 0.980 | 0.984 | 0.972 | 0.962 | 0.975 | 0.943 |
| 5. Daegi-ri | | | | | | 0.969 | 0.950 | 0.970 | 0.967 | 0.957 | 0.971 | 0.926 |
| 6. Mt. Sogri | | | | | | | 0.968 | 0.976 | 0.969 | 0.958 | 0.975 | 0.943 |
| 7. Mt. Doggyu | | | | | | | | 0.980 | 0.978 | 0.975 | 0.986 | 0.933 |
| 8. Mt. Chiri | | | | | | | | | 0.979 | 0.972 | 0.991 | 0.933 |
| 9. Pusan | | | | | | | | | | 0.983 | 0.985 | 0.931 |
| 10. Koche Isl. | | | | | | | | | | | 0.979 | 0.924 |
| 11. Chin Isl. | | | | | | | | | | | | 0.931 |
| 12. Chechu | | | | | | | | | | | | |

**Fig. 2.** Dendrogram based on Rogers' genetic similarity coefficients among 12 populations of *Elaphe dione*.

Rogers(1972)의 遺傳의 近緣值를 土臺로 Sneath and Sokal(1973)의 公式을 利用 UPGMA 값을 Bio-Sys program으로 電算處理하여 dendrogram을 作成한 結果는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 12個 集團은 3群으로 나누어져 珍島, 智異山, 德裕山, 巨濟島 및 釜山集團 사이는 平均 $\bar{S}=0.98$ 로 1群을 이루고 桂陽, 俗離山, 春川, 大基里, 江陵 및 高城集團 間은 平均 $\bar{S}=0.98$ 로 다른 1群을 形成하며 濟州集團과 他 集團間의 平均 $\bar{S}=0.930$ 으로

다소 差異를 나타냈다. 이 點은 集團間 形態 比較의 結果(白과 梁, 1984)와도 一致한다. 그러나 그 程度로 미루어 볼 때 亞種段階까지는 分化가 되지 않았다고 思料된다.

要 約

韓國產 누룩뱀(*Elaphe dione*)의 集團에 따른 遺傳的 變異를 調査하기 위하여 南韓의 12 個 集團에서 總 232個體를 採集하여 電氣泳動法에 의하여 分析한 結果 13個 酵素 및 蛋白質에서 17個의 遺傳子를 檢出하였다. 17個의 遺傳子 중 *Mdh-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Adh*, *Aco-3*, *Gp*, 및 *Got-1*의 9個 遺傳子는 전혀 變異가 없었고 모든 集團이 同一 對立因子였으며 *Mdh-1*, *Pgm*, *Pgi*, *Mpi*, *Pept*, *Est-2*, *Got-2*, 및 *6Pgd*의 8個 遺傳子는 變異가 있었고 集團에 따라 差異가 있었다.

各 集團間 平均 多型形頻度는 $\bar{P}=0.324$ 였으며 異型接合子頻度는 각기 $\bar{H}_D=0.0406$, $\bar{H}_C=0.0430$ 으로 이 값은 他 脊椎動物群의 平均 遺傳的 變異와 거의 同一하였다.

各 集團間의 平均 遺傳的 近緣值는 $\bar{S}=0.966$ 으로서 이 값은 同種內的 集團間 近緣值와 同一하였으며 濟州集團과 他 集團들과의 平均 遺傳的 近緣值는 $\bar{S}=0.933$ 으로 다소 낮은 편이었다.

以上の 結果와 形態變異에 대한 研究結果(白과 梁, 1984)를 綜合하여 볼 때 韓國產 누룩뱀(*Elaphe dione*)은 亞種 分化가 아직 形成되지 않은 狀態에 있다고 思料된다.

REFERENCES

- Avise, J.C., 1976. Genetic differentiation during speciation *In*: Molecular Evolution (F.J. Ayala, editor). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp.106-122.
- 士居寬暢, 1936. 朝鮮產 蛇類에 就て. 京城博物教育誌 第1錢. pp.41-45.
- Dumeril, A.M.C. and G. Bibron, 1854. Herpetologie generale cu histoire naturelle complete des reptiles. VII. Paris. pp.xvi+1-780, 15 Col. Pls. pt.1.
- 姜永善·尹一炳, 1975. 한국동식물도감, 동물편, 양서파충류. 17권. 문교부.
- 森爲三, 1928. 濟州道の兩生爬蟲類에 就て, 朝博誌, No. 6, pp.47-53.
- Pallas., 1773. *Coluber dione* Pallas, Reise Russ. Reichs, II, pp.717 (Cited from Pope 1935).
- Paik, N.K., Y.J. Kim, and S.Y. Yang, 1979. Biochemical variation and systematic status of the genus *Agkistrodon* (crotalidae). *Korea. J. Zool.*, 22:153-163.
- 白南極, 梁瑞榮, 1983. 韓國產 뱀亞科의 系統分類學的 研究. 江陵大學 論文集, 5:457-466.
- 白南極, 梁瑞榮, 1984. 韓國產 누룩뱀의 形態的 變異에 關하여. 江陵大學 論文集, 8:449-462.
- 白南極, 梁瑞榮, 1986. 韓國產 유혈목이 2亞種의 分類學的 研究. 한국동물분류학회지, 2:79-92.
- Pope, C.H., 1935. The reptiles of China. Nat. Hist. Central Asia X. Amer. Mus. Nat. Hist. New York.
- Rogers, J.S., 1972. Measure of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics VII. Univ. Texas Publ., 7213:145-153.
- Selander, R.K., 1976. Genetic variation in natural populations. *In*: Molecular Evolution (F.J. Ayala, editor). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp.21-45.
- Selander, R.K., M.H. Smith, S.Y. Yang, W.E. Johnson, and J.B. Gentry, 1971. Biochemical poly-

- morphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics VII. Univ. Texas Publ.*, 7103:49-90.
- Shannon, F.A., 1956. The reptiles and amphibians of Korea. *Herpetologica* 12:22-49.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman Co., San Francisco.
- Stejneger, L., 1907. Herpetology of Japan and adjacent territory. *U.S. Nat. Mus.* 58:1-577.
- Szynałes, Z., 1985. Occurrence of *Elaphe david* (Sauvage, 1884) (Serpentes: Colubridae) in the democratic peoples republic of Korea. *The Snake, Poland*, 17:163-167.
- Yang, S.Y., 1983. Genic variation in natural populations of the subfamily Acheilognathinae (Cypriidae). *Ann. Rep. Biol. Res., Jeonbuk Univ.*, 4:11-19.