

## 이종간의 핵치환에 의한 발생수행능력의 비교연구

이자경 · 정해문

서울대학교 사범대학 생물교육과

초기 발생과정에 있어서 핵과 세포질의 상호작용을 조사하기 위하여 양서류 한 종의 핵을 이종의 무핵 수정란에 치환하였다.

*Rana*속에 속하는 *R. dybowskii*, *R. nigromaculata*, *R. pipiens* 등의 이종간 잡종 개체의 경우 낭배초기를 전후하여 발생이 중지되며, *Rana*, *Xenopus* 그리고 *Axolotl*의 속간 핵치환에서는 후기 포배기에 발생이 중지되는 양상을 보인다. 이때 각 핵-세포질 조합의 발생수행능력을 비교하면 계통발생상의 유연관계가 먼 종일수록 초기에 발생이 중지되는 결과를 나타냈다. 일반적으로 양서류 종간 핵치환 결과는 후기 포배까지는 정상발생양상을 보이고 있다.

이와같이 잡종개체가 초기에 발생수행능력의 제한을 받는 요인은 두가지로 생각할 수 있는데, 치환된 핵에 비가역적 변화가 일어났을 가능성과 핵과 세포질간의 기능적 비양립성이 그것으로 현재로서는 후자가 좀 더 가능성 있는 요인으로 사료된다.

**KEY WORDS: Interspecific nuclear transplantation, Developmental capacity**

세포의 분화과정은 궁극적으로 핵내 유전자의 활동에 의한다. 유전자의 발현은 핵 주위의 환경에 의해 조절되는데, 이는 크게 세포내적인 것과 세포외적인것으로 대별할 수 있다. 전자는 세포질 자신의 지역적 분포의 차이 (cytoplasmic localization)고 후자는 세포의 외부환경으로부터 오는 영향을 의미한다(Davidson, 1986). 핵과 세포질의 상호작용은 가장 중요한 세포내적인 조절요인으로서 발생도중 일어나는 유전자 활동의 방향에 영향을 끼치게 된다.

발생도중 유전자의 비가역적 소실 여부를 조사할 수 있는 가장 적절한 방법으로 개발, 발전되어 온 핵치환 기술은 초기 발생동안의 핵과 세포질의 상호작용을 규명하는데 중요한 정보를 제공해 주고 있다(Briggs, 1952; Gallien *et al.*, 1973). 즉, 분화된 세포로부터 핵을 이식받은 난자의 발생과 분화정도는 공여 세포핵이 완전한 유전자를 보유하고 있는지의 여부와 핵과 수여난자의 세포질과의 상호작용의 정도를 시사해준다. 일반적으로 발생이 진전된 핵일수록 발생수행능력의 감소현

상을 보이는데 이는 세포의 분화 과정에서 핵내 유전자에 모종의 변화가 일어났기 때문으로 믿어진다 (Mckinnell, 1972; Gurdon, 1962). 개체 발생 과정에서 핵과 세포질의 어느부분이 어느정도로 형태 형성 수행에 관여하는지를 이해하는데는 핵을 이종의 세포질에 치환시켜 보는 방법이 있다. 즉, nucleocytoplasmic hybrid를 만들어 개체 발생에서 핵과 세포질의 역할 규명 및 그들의 상호관계의 연구가 가능하다(Gallien, 1979; Gurdon, 1986). Hennen(1965, 1967)에 의하면 *Rana pipiens*와 *Rana palustris*의 조합의 경우 초기 larva까지의 생존을 보이며 독특한 발생 결함을 나타낸다고 보고하였다. Gallien 등은 pleurodeles를 사용한 경우 난자로 사용한 종의 기여는 색소, egg size 등의 egg에 관한 것 뿐이며 이후의 발생 양상은 핵 유전자의 특징에 의하여 지배된다고 하였으며, 이는 isoenzyme의 pattern을 발생단계로 추적한 결과에서 명확히 증명된 바 있다(Gallien *et al.*, 1973). 한편 치사조합의 경우는 일부의 유전자만 발현되면서 낭배 전후시기에 예외없이 치사현상을 나타낸다(Gurdon, 1969). 현재까지 수행된 각 조합의 결과를 종합해보면 일반적으로 계통 발생상의 거리가 가까운 종일수록 정상발생 및

본 연구는 1986년도 과학재단과 대우재단의 후원에 의해 진행되었음.

후기 배까지의 생존이 가능하다.

본 연구에서는 국내 서식종 무미 양서류 중에서 비교적 계통 발생상 유연관계가 가까운 종인 참개구리(*Rana nigromaculata*)와 북방 산개구리(*Rana dybowskii*)를 택하고, 그외 무미양서류로서 아프리카 원산 *Xenopus laevis*, 북미산 *Rana pipiens* 그리고 유미양서류인 Mexico 원산 *Ambystoma mexicanum*을 사용하여 국내종간 혹은 국내종과 국외종간의 종간핵치환을 수행하여 각 조합에 따른 종간잡종의 생존도를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에서는 국내 서식 종으로는 북방 산개구리(*Rana dybowskii*)와 참개구리(*Rana nigromaculata*)를 사용하였고, 국외종으로는 남아프리카 원산인 *Xenopus laevis*, 북미산표범개구리 *Rana pipiens*, 멕시코 원산인 Axolotl(*Ambystoma mexicanum*)을 이용하였다. 국내서식종은 동면 중, 혹은 동면 직후에 채집한 즉시 암수를 분리하여 4-5°C의 가동면 상태를 유지시켰다가 필요할 때 실온에 꺼내어 사용하였다. *Xenopus*와 axolotl 및 북미산 표범개구리는 구입 후 상온에서 사육하면서 암수 교배 또는 인공수정 시켰다.

### 인공배란 및 수정

*Rana*-개구리의 배란과 인공수정은 통상 이용되는 Hamburger의 방법에 따랐다. 즉, 성숙한 암컷의 복강내에 3-4개의 뇌하수체로 만든 현탁액을 주사하여 배란을 유도하고, 그 위에 정충 현탁액을 뿌려주어 인공수정 시켰다.

수정란은 10% Steinberg액에서 발생시켰고 발생의 각 단계는 Shumway stage(1940)를 참조하였다.

*Xenopus*-교접 12시간전에 암수의 lymph sac에 Human chorionic gonadotropin(HCG, Sigma)을 주사하고(수컷 150 IU, 암컷 300 IU) 한통에 넣어 배란과 수정을 유도하였다. 수정후 발생의 각 단계는 Nieuwkoop & Farber(1956) stage를 참조하

였다.

Axolotl-사육중인 성숙한 암수를 한통에 넣어 교접을 유도한 후 수정난을 채취, 사용하였다.

### 핵치환의 방법

*Rana* 종류는 Briggs와 King의 방법(1952)을 *Xenopus*는 Gurdon의 방법(1962)을 따랐으며, 그 방법을 요약하면 다음과 같다.

무핵난의 형성-*Rana* 종류는 자외선을 조사하여 (640 ergs/mm<sup>2</sup>) DNA를 파괴시킨 정자로 수정시킨 후, 제2극체 방출시 예리한 유리침으로 exovate를 만들어 난핵을 제거한다, *Xenopus*는 미수정난에 자외선을 조사하여 (4,000 ergs/mm<sup>2</sup>) 난핵의 제거와 활성화를 동시에 수행하였다.

공여 세포의 준비-*Rana*와 *Xenopus* 공히 후기 포배단계에 도달한 embryo를 예리한 forceps으로 vitelline envelope을 벗기고, 핵이식 1-2시간전에 이들을 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 제거한 100% Steinberg액에서 protease와 EDTA를 처리하여 세포를 분리시킨다.

핵치환 방법-분리된 세포들의 핵을 micromanipulator를 사용하여 무핵의 난에 주입하였다. 이때, 과다한 세포질의 유출을 방지하기 위하여 상기 용액으로 만든 20% Ficoll 용액에서 핵치환을 수행하며, 상체가 치유된 후에는 10% Steinberg액으로 옮긴다.

### 발생정도의 조사

종간 핵치환 개체의 생존도-종간핵치환된 개체가 초기 발생에서 치사되는지 또는 생존 가능한지의 여부를 판정한 후 발생정도를 조사한다.

## 결 과

이종간의 인공수정 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 수정의 성공률은 사용한 종의 조합 및 그들의 암수 조합에 따라 다른 양상을 보이고 있다. 즉, *R. dybowskii*와 *R. nigromaculata*와의 조합은 *R. nigromaculata*의 egg와 *R. dybowskii*의 sperm을 사용한 경우만 수정이 가능한 데 이때는 거의 control과 같은 수정률을 보인다. 이들은 포

**Table 1.** Development of fertilized controls of interspecific hybrid

Cross	Total embryo	No. of cleavage	Development				Normal tadpoles
			Blastulae	Gastrulae	neurulae	Post-neurulae	
R. dyb. x R. dyb.	93	87(94%)	86(90%)	84(90%)	83(89%)	—	83(89%)
R. pip. x R. pip.	68	62(91%)	61(90%)	0(0%)	—	—	61(90%)
R. nig. x R. nig.	110	102(93%)	99(90%)	91(83%)	89(81%)	—	89(81%)
R. nig x R. dyb.	87	75(86%)	71(82%)	0(0%)	—	—	0(0%)
R. dyb. x R. nig.	108	0(0%)	0(0%)	0(0%)	—	—	0(0%)
R. pip. x R. dyb.	76	68(89%)	68(89%)	0(0%)	—	—	0(0%)
R. dyb. x R. pip.	84	0(0%)	0(0%)	—	—	—	0(0%)

R. dyb. *Rana dybowskii*; R. nig. *Rana nigromaculata*; R. pip. *Rana pipiens*.

**Table 2.** Development of interspecific nuclear transplant embryos

Type of embryo	Total transfers	None or abortive cleavage	Development				
			Early blastula	Late blastula	Early gastrula	Mid gastrula	Tadpoles
Donor recipient							
R. dyb → R. pip	59	12	44(75%)	41(69%)	18(31%)	2(3%)	—
R. dyb → R. nig	62	17	39(63%)	36(58%)	1(2%)	—	—
R. nig → R. dyb	63	18	40(63%)	38(60%)	3(5%)	—	—
controls							
R. dyb → R. dyb	60	12	42(70%)	39(65%)	29(48%)	27(45%)	18(30%)
R. nig → R. nig	60	18	39(65%)	36(60%)	30(50%)	29(48%)	13(22%)

R. dyb. *Rana dybowskii*; R. nig. *Rana nigromaculata*; R. pip. *Rana pipiens*

배기까지는 정상적인 발생을 보이거나 낭배초기에 이르러 원구가 형성되기 직전에 발생이 중지된다. *R. dybowskii*와 *R. pipiens*의 조합도 비슷한 경향을 보여 *R. dybowskii*를 sperm으로 사용한 경우에 수정이 가능하여 중기포배기까지의 발생을 보이다가 역시 발생이 중단된다. 반면에 동종간의 대조군의 경우 90% 이상의 수정률을 보이며 80% 이상이 올챙이 시기에 도달하는 정상발생을 보이고 있다.

핵치환은 국내 서식종인 *R. dybowskii*와 *R. nigromaculata* 그리고 국외서식종인 *R. pipiens*, *Xenopus laevis*, *A. mexicanum*의 총 5종의 조합으로 진행되었다. Table 2는 그 중에서 *Rana*에 속하는 3종간의 종간핵치환 결과를 나타낸 것이다. *R. dybowskii*와 *R. pipiens*의 조합은 donor와 recipient에 상관없이 상실기 정도까지의 초기 분열은 *R. dybowskii*를 사용한 동종간의 핵치환 경우와 거의 같은 정도의 정상 발생을 나타낸다. 그러나

상실기 이후 점진적인 생존률 감소를 보이다가 원구함입이 일어난 직후에 더이상의 낭배운동이 진행되지 못하고 발생이 모두 중지된다. 이들은 비정상적인 낭배운동으로 외향 낭배운동(exogastulation)과 비슷한 양상을 나타내며 24시간 이상 발생중지 상태를 유지하다가 결국 모두 세포질 분해를 일으킨다.

*R. dybowskii*와 *R. nigromaculata*의 조합에서도 같은 경향을 보여주며, 이 경우는 낭배운동을 거의 일으키지 못하고 그 직전에 모두 치사한다. 대조군의 실험에서 동종간의 수정란이 올챙이까지의 도달률이 동종끼리 수정시킨 경우의 80-90%, 또 동종간 핵치환의 경우 20-30%인 것과 비교해 보면 상기 두 조합은 치사조합임을 알 수 있다. Fig. 1은 상기 *Rana* 조합간의 발생율을 그림으로 나타낸 것이다.

Table 3은 다른 속간의 핵치환 결과로, 관찰된 모든 경우에서 후기 포배기에 치사하는 것을 보여

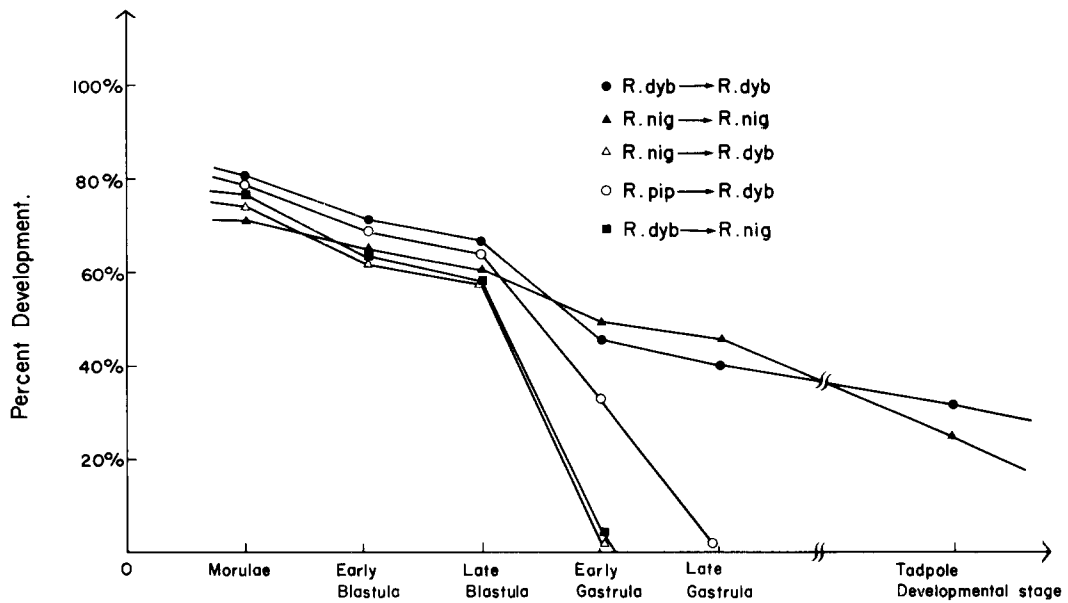


Fig. 1. Developmental capacity of embryos of nucleocytoplasmic hybrid between *Rana* species.

Table 3. Development of inter-generic nuclear transplant embryos.

Type of embryo	Total	None or abortive cleavage	Development				
			Early blastula	Late blastula	Early gastrula	Mid gastrula	Tadpoles
Xenopus → <i>R. dyb</i>	63	18	13(21%)	11(17%)	—	—	—
<i>R. dyb</i> → Xenopus	54	21	19(36%)	17(31%)	—	—	—
Axolotl → <i>R. dyb</i>	41	14	15(36%)	14(33%)	—	—	—
Axolotl → Xenopus	23	8	9(39%)	7(30%)	—	—	—

*R. dyb*, *Rana dybowskii*.

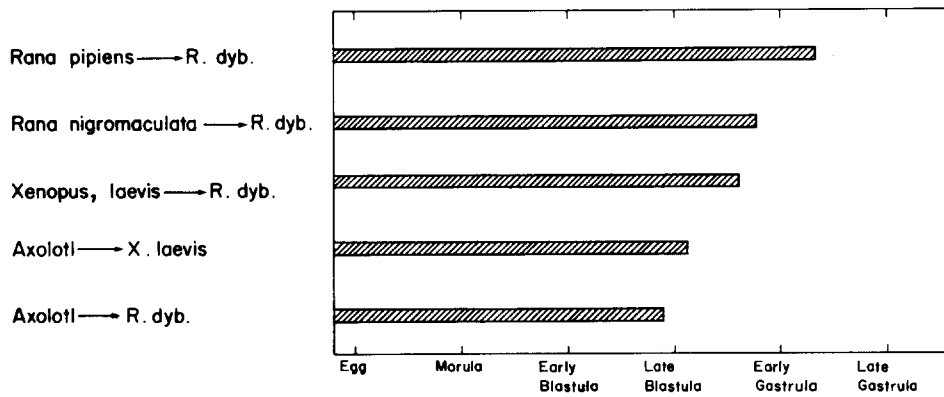


Fig. 2. Developmental arrest of embryos of nucleocytoplasmic hybrid. Note the phenomenon that the greater the taxonomic difference between two species, the earlier arrest in development takes place.

준다. 앞의 중간 핵치환의 경우에 비해 초기 분열 및 초기 발생율이 매우 낮으며 또한 포배기 도달 비율도 현저히 저하된다. 이들은 포배기에서 24시간 이상 발생이 중지된 상태를 유지하다가 세포질이 분해되는 비슷한 양상을 보인다. 위 조합의 경우는 인공수정조차도 불가능한 조합임이 실험결과 밝혀졌다(data not shown).

Fig. 2는 지금까지 수행된 중간, 속간 핵치환의 조합이 발생을 수행할 수 있는 최종단계를 그림으로 나타낸 것이다.

## 고 찰

개체발생 도중 일어나는 핵과 세포질의 상호관계에서 핵과 세포질의 어느부분이 어느정도로 또 어떻게 조화된 형태 형성의 수행에 관계하는지를 알아보는 방법으로 과거에는 자연 또는 인공적인 수정을 통한 중간잡종 실험을 수행하였다(Moore, 1955; Fankhauser, 1955). 이와 같은 중간수정 실험은 난자를 제공한 세포핵을 제거하지 못함대에 따른 문제점이 있었으며, 이와는 달리 핵을 미리 제거한 난자로 수정시킨 androgenetic haploid의 경우 핵과 세포질의 제공자가 구별되는 이점이 있으나 올챙이 시기에 모두 치사한다는 결점이 있었다(Briggs, 1959). 그러나 핵치환 기술을 중간잡종에 적용한 경우, 즉 한종의 핵을 타종의 무핵수정난에 주입하게 되면 개체 발생에서 핵과 세포질의 역할을 명확히 구별하여 그들의 상호관계를 연구할 수 있다.

Table 1의 대조실험에서 보여주듯이 이종간의 인공수정은 모두 낭배를 전후하여 치사를 나타내는데 이 현상은 이종간의 수정을 통하여 난의 활성화는 가능하지만 낭배기전에 유전자의 발현이 요구되는 midblastula transition시기에 정상적인 핵의 활동이 진행되지 않는 관계로 치사하는 것으로 보인다. 이와같이 이종간의 수정이 가능한 경우는 동종이나 아종간의 사이에만 국한된다.

본 연구에서 이종간의 핵치환은 중간, 속간의 두 경우로 나누어 진행하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 동종간의 핵치환 경우에 비해 이종간의 핵치환의 경우는 낭배운동 전에 모두 발생이 중지

된다. 이미 보고된바에 의하면 이종간의 핵치환은 생존가능한 조합과 치사조합으로 대별할 수 있는데 생존조합은 아종사이 혹은 일부 이종간의 핵치환의 경우에만 가능하다. 이때 핵치환된 embryo의 최초의 유전자 발현시기는 후기 포배기로 control과 같으며 그 발현 양상도 동일하다(Gallien, 1979). 치사조합의 경우는 대부분의 이종간 조합과 그 외의 속간의 조합에서 나타나는데 본 실험의 *Xenopus*, *R. dybowskii*, *Axolotl* 간의 3조합도 치사조합임을 알 수 있다. 치사조합의 경우는 포배기부터 부화기 사이 이른바 결정적 시기에 발생이 정지되는 것으로 알려지고 있는데 본 실험의 경우에는 포배기가 진행되는 동안 모두 치사한 것으로 나타났다. 이들의 치사원인은 확실히 밝혀진바가 없으나 대략 두가지로 설명이 가능하다고 여겨진다. 즉, 치환된 핵에 비가역적인 변화가 일어났을 가능성과 치환된 핵과 세포질 사이의 기능적 비양립성이다. 그러나 포배기에 도달한 nucleocytoplasmic hybrid의 핵을, 핵을 제공한 세포질로 다시 역핵치환 시킨 결과 정상 발생이 진행되며, 또 완전한 유전자를 보유하고 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 현재로서는 핵과 세포질간의 기능적 비양립성 때문일 가능성이 크다고 보아진다(Hennen 1965, 1967; Gallien, 1979).

다른 속간의 핵치환의 경우 발생률이 현저히 저하되는데 이는 계통발생상의 거리가 먼종일수록 발생수행능력이 저하되는 현상을 보이는 것으로서(Fig. 2), Gurdon(1969)이나 Gallien(1973, 1979) 등이 여타의 무미양서류를 재료로한 실험의 결과와 일치한다.

이는 핵의 유전자를 발현 혹은 조절시키기 위한 세포질의 signal이 종특이성 현상을 나타내어 이종핵의 유전자를 발현시키기 못하거나 또는 형성된 gene products와 이종 세포질과의 incompatibility가 존재하기 때문인 것으로 사료된다. 결국 nucleocytoplasmic hybrid 개체의 경우 핵과 세포질 사이의 비양립성(incompatibility)으로 인하여 초기발생도중 치사할 가능성이 대단히 높다고 하겠다. 이와 같은 치사원인을 규명하기 위한 한 방법으로 donor 핵의 세포질 일부를 핵과 함께 주입함으로써 핵의 활동을 유도하는 방법이 시도되어야 할 것으로 현재 본 연구실에서 진행중에 있다.

### 引用文献

- Briggs, R. and T. J. King, 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**:455-462.
- Briggs, R., 1959. Nucleocytoplasmic interactions in eggs and embryos. In: *The Cell*, (Brachet, J. and A. E. Mirsky, eds.), New York, Academic Press, pp. 537-617.
- Davidson, E., 1986. Gene activity in early development. Academic Press, New York.
- DiBerardino, M. A., 1979. Nuclear and chromosomal behavior in amphibian nuclear transplantation. *International Review of Cytology Suppl.* **9**:129-160.
- Frankhauser, G., 1955. The role of nucleus and cytoplasm. In: *Analysis of Development*. (Willier, B. H., P. A. Weiss, and V. Hamburgers, eds.), Philadelphia, Saunders, pp. 126-150.
- Gallien, C. L., C. Aimar and F. Fuillet, 1973. Nucleocytoplasmic interactions during ontogenesis in individuals obtained by intra- and interspecific nuclear transplantation in Genus *Pleurodeles* (Urodele Amphibian). *Devel. Biol.* **33**:154-170.
- Gallien, C. L., 1979. Expression of nuclear and cytoplasmic factors in ontogenesis of amphibian nucleocytoplasmic hybrids. *International Review of Cytology Suppl.* **9**:189-197.
- Gurdon, J. B., 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. exp. Morphol.* **10**:622-645.
- Gurdon, J. B., 1969. The Transplantation of nuclei between two subspecies of *Xenopus laevis*. *Proc. Roy. Soc. B.* **173**:305-315.
- Gurdon, J. B., 1986. Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *Journal of Cell Science Suppl.* **4**:287-318.
- Hamburger, V., 1960. A manual of experimental embryology. The Univ. Chicago Press, Chicago.
- Hennen, S., 1965. Nucleocytoplasmic hybrids between *Rana pipiens* and *Rana plustris*. *Devel. Biol.* **11**:243-267.
- Hennen, S., 1967. Nuclear Transplantation Studies of nucleocytoplasmic interactions in amphibian hybrids. In: *The Control of Nuclear Activity*. (Goldstein, L. ed.) Prentic-Hall Inc.
- Mekinnell, R. G., 1972. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J. of Heredity* **36**:199-207.
- More, J. 1955. Abnormal combinations of nuclear and cytoplasmic systems in frogs and toads. *Adv. in Genetics* **7**:139-148.
- Nieuwkoop, P. D. and J. Faber, 1956. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2nd ed. North-Holland, Amsterdam.
- Shumway, W. 1940. Stage in the normal development of *Rana pipiens*, I. External form. *Anat. Rec.* **78**:139-152.
- Steinberg, M., 1957. Carnegie Institute Washington Year Book **56**:347-354.

(Accepted December 1, 1987)

---

### Comparative Studies on the Developmental Capacity by Interspecific Nuclear Transplantation

Ja-Kyeong Lee and Hae-Moon Chung (Dept. of Biology Education, College of Education, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea)

In order to investigate the role of nuclei and cytoplasm in early embryogenesis, interspecific nuclear transplantation was carried out. Nuclei of one species of amphibian was transplanted into enucleated egg of another species.

In interspecific hybrids between *Rana* species, development was arrested before or right after the dorsal lip formation. In intergenetic hybrids between *Rana*, *Xenopus* and axolotl, developmental arrest took place at late blastula stage. Comparing the developmental capacity of each nucleocytoplasmic hybrid, the more distantly related the species, the earlier does development arrest. The general rule is that nuclear transfers between any amphibian species will form a regularly cleaved late blastula.

Two plausible factors relate to limitation of the developmental capacity of nucleocytoplasmic hybrids. One is an irreversible change in grafted nuclei and another is functional incompatibility between the recipient cytoplasm and transplanted nucleus. The later is postulated a more possible cause of the arrestment.