Korean J. Zool. 35:518-525, 1992

중력장의 변화가 양서류 초기 발생에 미치는 영향

이은정 • 정해문

서울대학교 사범대학 생물교육과

본 연구에서는 horizontal clinostat과 원심분리 방법의 이용으로 각각 저중력 상태(μG)와 고중력 상태(3G)를 유도하여, 중력장의 변화가 양서류 수정란의 초기 형태 형성에 미치는 영향을 북방산개구리(***Rana dybowskii***)를 대상으로 조사하였다.

중력장의 변화는 첫번째 수평 분열인 제3분열면의 위치에 영향을 미쳤다. 즉 저중력 상태에서는 분열면이 적도면 근처에서, 또 고중력 상태에서는 분열면이 동물극 근처에서 형성되었다. 이와 같은 변화는 포배기로 이어져 할강의 위치와 동물극 정단 세포층 수에 영향을 미쳤다. 즉 저중력에 노출된 포배는 정상배(1G)에 비해 할강이 중앙에 위치했으며 동물극 정단의 세포층 수가 증가하는 반면 고중력에 노출된 포배는 할강이 보다 동물극 쪽에 위치했으며 동물극 정단의 세포층 수도 감소하였다. 그러나 낭배기에 도달하면 동물극 정단 세포층 수의 차이는 정상 상태로 조절되었다. 한편 중력장의 변화는 낭배기에 이르는 발생 속도와 원구상순부의 위치를 변경시켰다. 낭배기 이후의 발생 단계에서 중력에 의한 변화로는 tail fin circulation(stage 22)시기의 머리크기의 변화를 들 수 있다. 이상의 결과로 무미 양서류의 초기 형태 형성은 중력장에 의해 변형될 수 있으며 이러한 변화는 발생이 진행됨에 따라 조절되는 것으로 보인다.

KEY WORDS: *Rana dybowskii*, Gravitational field, Microgravity, Centrifugation, Clinostat, Cleavage furrow, Blastula, Gastrula

양서류의 미수정란은 동물극과 식물극을 잇는 선에서 방사대칭을 나타낸다. 수정직후 일어나는 난의 활성화는 일련의 비대칭적 현상을 개시하는데, 여기에는 피층 변화(Hara *et al.*, 1977), 정자 성상체의 성장(Ubbels *et al.*, 1983) 및 평행성 미세소관에 의한 피층 회전(Vincent and Gerhart, 1987) 등이 포함된다. 한편 피층 반응의 결과 난황막으로부터 유리된 수정란은 중력에 의하여 비중이 작은 동물 반구가 위로 향하고 비중이 큰 식물 반구가 아래로 향하는 난의 회전을 일으킨다. 이와 같은 일련의 변화는 수정란의 배-복측 극성을 유발하여 초기배의 제 일차 배축을 형성한다(Elinson, 1975).

초기 세포질의 이동은 세포질을 점차적으로 작은 단위, 즉 할구로 분배하는 난할면에 의해 안정화되며, 난할이 진행되는 동안 세포질 요소들이 자유롭게 작용하여 각 할구에 영향을 미칠 수 있는 기회가 점차로 제한된다(Moody and Kline, 1990). 초기 양서류란의 난할은 배의 전사가 개시되는 중기포배전이기(mid-blastula transition)에 도달할 때까지 급속히, 그리고 거의 동시적으로 일어난다(Hara *et al.*, 1977). 그러나 모든 난할면이 난세포질의 동등한 분배에 관계하는 것은 아니다. 제1, 제2 난할면은 종측으로 서로 대칭되게 일어나며, 배의 좌우측 결정과 관계된다(Masho, 1988). 횡측으로 일어나는 제3 난할은 최초의 비대칭 분열로, 배의 윗쪽 부위를 예정 외배엽으로, 아래쪽 부위를 예정 중배엽 및 내배엽으로 분할한다(Masho, 1988). 이와 같은 난할면의 위치는 초기 형태 형성에 중요한 요인으

본 연구는 한국 과학 재단의 후원(한미 공동 연구)하에 이루어진 것임.

로 작용한다. 즉 난할을 통해 형태 형성 결정소로 가정되는 세포질 요소가 배의 다양한 지리학적 영역으로 나뉘어져 세포 운명의 결정에 관계하며, 초기 분화 양상을 특정짓는 세포들의 상호작용에 관련된 세포막의 위치가 결정된다(Moody and Kline, 1990).

양서류의 초기 발생에서 세포질의 재배치, 난할면의 위치와 같은 형태 특성화에 중요한 현상들은 중력의 영향을 받는다. 수정란을 중력에 대하여 새로운 방향으로 임의로 변경시킬 경우 배-복측 극성 결정과 발생 양상에 큰 변화를 초래한다(Scharf and Gerhart, 1980; Chung and Malacinski, 1980, 1982; Chung and Han, 1984). 이에 본 연구에서는 horizontal clinostat을 이용한 저중력 상태와 원심분리를 이용한 고중력 상태의 유도를 통해 초기 형태 형성의 변화가 계속되는 발생에 미치는 영향에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료 및 준비과정

본 연구에서는 국내 서식종 무미양서류인 북방산개구리(*Rana dybowskii*)를 재료로 사용하였으며, 이들의 인공배란과 수정은 종전과 같은 방법(Hamburger, 1960; Chung and Malacinski, 1980)으로 수행하였다. 수정 후 6분이 경과되었을 때 약 30~40개의 알을 각각 작은 cellophane 주머니(Falcon Cultu SAK^{TM} baggie, Becton Dickinson, USA)에 넣고, 약 5 ml의 10% Steinberg 용액을 채운 후 열로 봉하였다. 수정 후 8분 내에 저중력 및 고중력 조건을 위해 설치된 정속회전대 장치(horizontal clinostat)와 원심분리기에 baggie를 부착시켰으며, 실험실 조건하에서 배양시킨 알을 대조군으로 삼았다.

중력장의 변화

Horizontal clinostat 장치를 이용하여 수평축을 기준으로 수정란을 느린 속도로 연속 회전시킴으로써 중력을 감소시켜 저중력 상태를 유도했다(Neff *et al.*, 1985). 본 연구에서 저중력 조건 유도를 위해 사용된 정속회전대의 회전속도는 12 rpm으로 고정하였다. 고중력은 원심분리장치를 응용하여 유도하였고 회전속도는 120 rpm으로 고정하였다.

표본제작

적당한 발생단계에 도달한 배는 한천층을 제거한 뒤 PBFG(Phosphate Buffered 4% Formalin—2.5% Glutaraldehyde)에 하루 동안 고정했다. 고정된 배는 phosphate buffer로 2회 세척한 뒤에 25% ethanol과 75% phosphate buffer를 포함한 용액에 옮겨 보관하였다. 난할면 위치 관찰을 위해 8세포기에 고정된 배의 AVCR(Animal/Vegetal Cleavage Ratio: 전체배의 길이에 대한 동물반구 할구의 길이의 비) 값을 ocular micrometer가 부착된 해부현미경을 이용하여 측정하였다. 중기포배기(stage 8) 및 원구상순부시기(stage 10)에서 고정된 배는 예리한 면도칼로 동물극에서 식물극으로 절단하여 동물극 정단 세포층수와 함입부위(involution site)를 관찰하였으며, 특히 원구상순부시기의 배는 함입부위를 가로질러 절단한 뒤 관찰하였다. 원구상순부시기에 cellophane 주머니로부터 회수한 배의 일부는 tail fin circulation (stage 22) 시기까지 키운 후 동일한 방법으로 고정한 뒤 머리 크기를 관찰하였다.

결과

중력에 의한 제3분열면의 위치 결정

이상 중력 조건에서 발생한 *Rana*의 8세포기 배에서 제3분열면의 위치는 그림 1과 같다. 저중력 상태에서 발생한 배의 제3분열면은 정상 조건에서 발생한 배에 비해 적도면 가까이에 형성되었다. 반면 고중력 상태에서 발생한 배의 제3분열면은 동물극 가까이에 위치했다.

제3분열면의 위치를 AVCR를 이용하여 수치

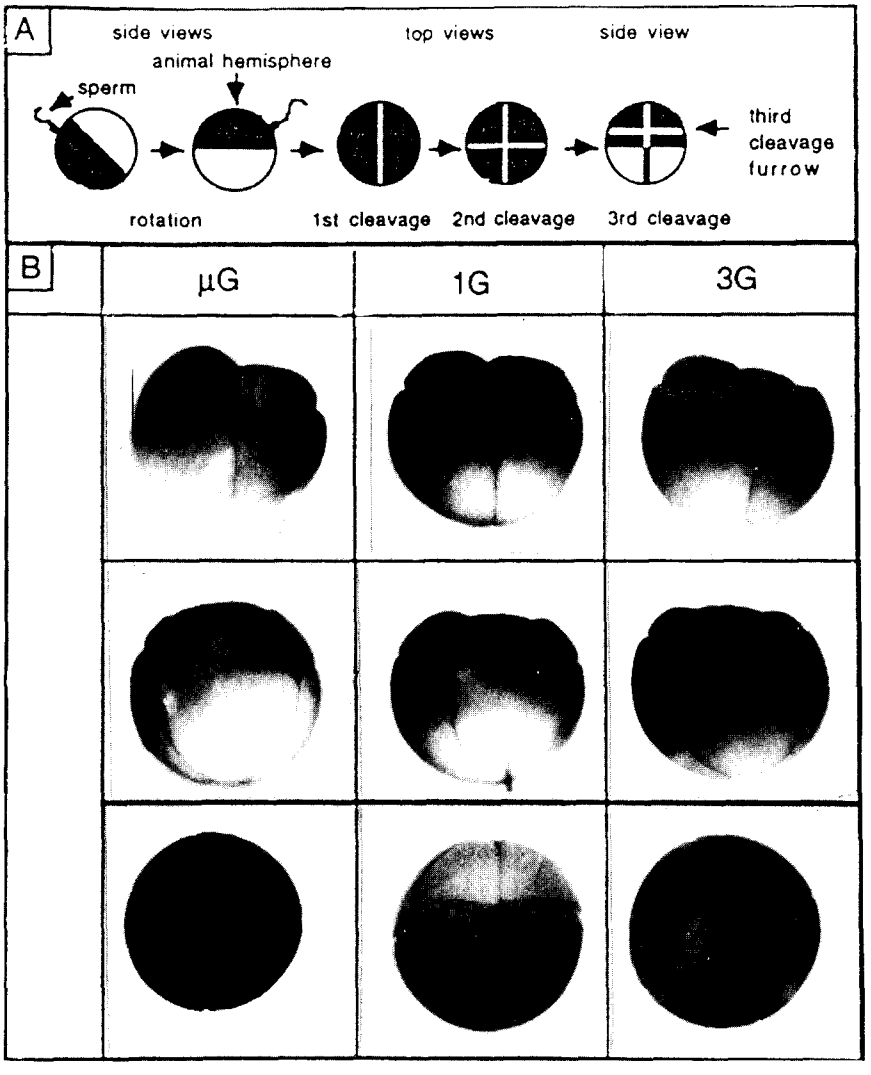

Fig. 1. The location of the first horizontal cleavage furrow (third) along the animal/vegetal axis. (A) Diagram of the formation of the first three (typical) cleavage furrows. Egg rotation response to activation is triggered by sperm entrance. (B) Representative examples of the location of the third cleavage furrow in *Rana dybowskii* embryos exposed μG, 1G and 3G.

화한 결과 그 값이 0.26인 정상배에 비해 저중력 조건에서 발생한 배의 값은 0.32, 고중력 조건에서 발생한 배의 값은 0.17로 큰 차이를 보임을 알 수 있었다(그림 2).

난할면 위치의 변화는 할구의 크기에 영향을 미쳤다. 즉, 저중력 상태에서와 같이 분열면이 적도면 근처에 놓이게 되면 동물반구쪽의 할구와 식물반구쪽의 할구는 거의 동일한 크기를 갖는 반면 고중력 상태에서는 분열면이 동물극 가까이에 놓이므로 동물반구에 비해 식물반구는 상당히 큰 할구를 갖게 된다.

이상 중력장에 의한 할강의 위치와 동물극 정단 세포층의 변화

양서류 발생에 있어서 처음 12분열까지의 난할은 동식물반구에서 거의 동시적으로 일어나

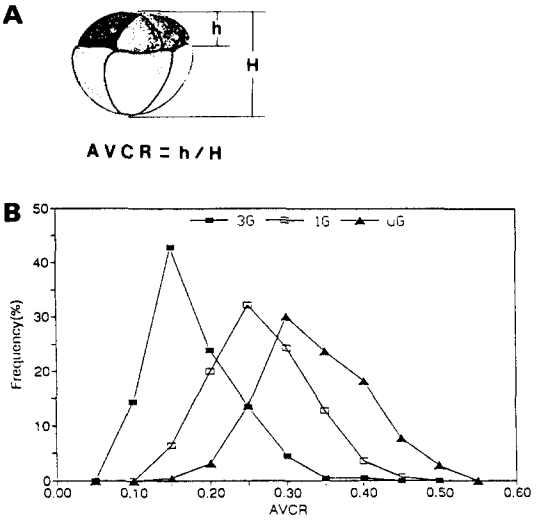

Fig. 2. Quantitation of the response of the *Rana dybowskii* third cleavage furrow to μG and 3G exposure. (A) Determination of animal vegetal cleavage ratio (AVCR). The height of the animal blastomeres (h) is compared to the total height (H) of the embryo. (B) Pooled AVCR data from 560 embryos derived from 5 spawnings.

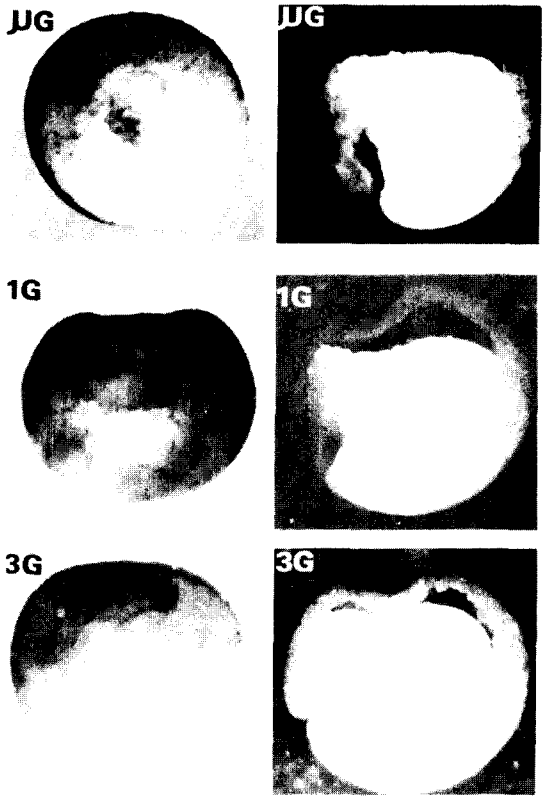

Fig. 3. The location of the blastocoel in midblastula (left) and the location of the dorsal lip of the blastopore in gastrula (right).

며(Hara *et al.*, 1977), 난할이 진행됨에 따라 할강이 형성되어간다. 이상 중력장에서 발생한 배에서 할강의 위치는 그림 3과 같다. 저중력 상태에서 발생한 배의 할강은 정상조건에서 발생한 배에 비해 중앙에 위치하였으며 일부는 할강이 식물극에 치우쳐 형성되기도 했다. 또 저중력 조건에서 발생한 배의 할강은 정상배에 비해 원형에 가까운 형태를 보였다. 반면 고중력 상태에서 발생한 배의 할강은 동물극쪽에 치우쳐 형성되었다.

할강의 위치가 중력 조건에 따라 변하므로 동물극 정단 세포층도 영향을 받게 된다. 즉, 정상배의 4~6층에 비해 저중력 조건에서의 배는 6~11층으로 상당히 많은 세포층이 형성되었으며 고중력 조건에서의 배는 1층~2층 정도의 세포층만이 형성되었다(그림 4).

이상 중력장에 의한 원구상순부의 위치 변경과 발생속도의 변화

그림 3은 이상 중력 조건하에서 발생한 낭배기의 배에서 함입이 시작되는 위치를 보여준다. 정상배와 비교할 때 저중력 조건에서 발생한 배에서는 식물극 가까이에서 함입이 시작되었으며 고중력 조건에서 발생한 배에서는 적도면 가까이에서 함입이 시작되었다(그림 5).

이상 중력장은 원구상순부의 위치 뿐 아니라 형성시기에도 영향을 미쳤다. 그림 6은 일정시간 안에 낭배시기에 도달한 배의 비율을 나타낸 것이다. 저중력 조건에서는 정상배보다 배의 발생속도가 빨랐으며 고중력 조건에서는 배의 발생속도가 정상에 비해 느렸다. 이러한 발생속도의 차이는 그림 3의 함입 정도로도 확인할 수 있다.

초기 형태 형성 변화의 조절

중력장 변화로 초래된 초기 형태 형성에서의

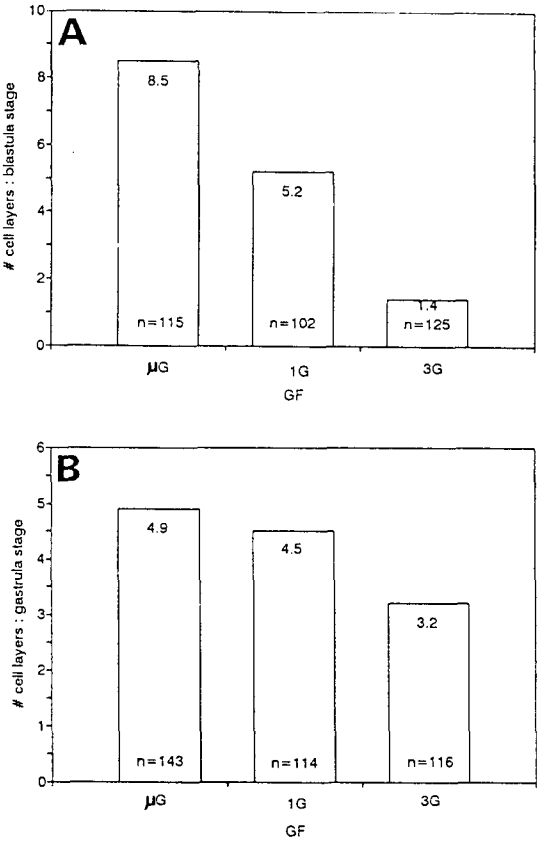

Fig. 4. The number of cell layers in the blastocoel roof. (A) The mean number of cell layers in the blastocoel roof of μG, 3G exposed and normal embryos at blastula stage. (B) The mean number of cell layers in the blastocoel roof of μG, 3G exposed and normal embryos at gastrula stage.

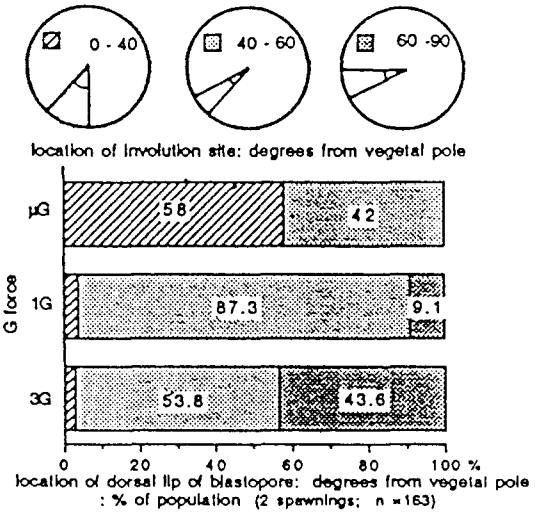

Fig. 5. Quantitation of novel gravitational field effects on the location of involution site.

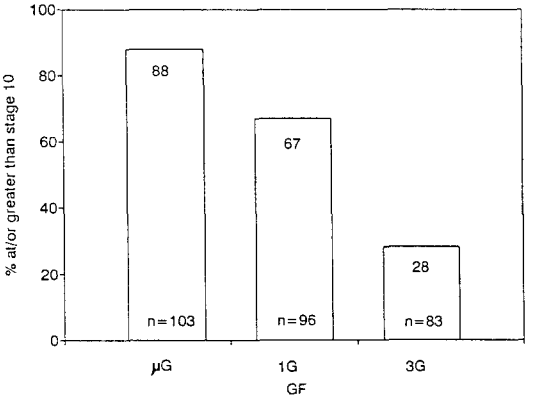

Fig. 6. The rate of development to the gastrula stage. The proportion of embryos exposed to μG that reach at least stage 10 is greater than the case for 3G embryos or for 1G controls.

변화는 낭배기에 이르러 조절되는 것으로 나타났다. 즉 포배기에 큰 차이를 보이던 동물극 정단 세포층 수는 발생이 진행됨에 따라 정상 수준으로 회복되어 발생 후기에는 형태적인 차이가 거의 나타나지 않았다. 다만 저중력 조건에서 발생한 tail fin circulation(stage 22) 시기의 배는 머리부위가 다소 확대되었으며 고중력 조건에서는 다소 축소되었다(그림 7). 그러나 이러한 차이도 발생이 진행됨에 따라 감소하였다.

고찰

본 연구에서는 실험적으로 부여한 중력장의 크기 변화가 무미양서류의 초기발생에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 정상 중력보다 강하거나 약한 중력장은 양서류 초기배의 형태형성에 변화를 가져오며 중력의 영향은 발생의 후기 단계(낭배기 이후)보다 초기 단계(낭배기 이전)에서 더 크게 나타났다. 중력장의 크기 변화는 다른 무미 양서류인 *Xenopus laevis*

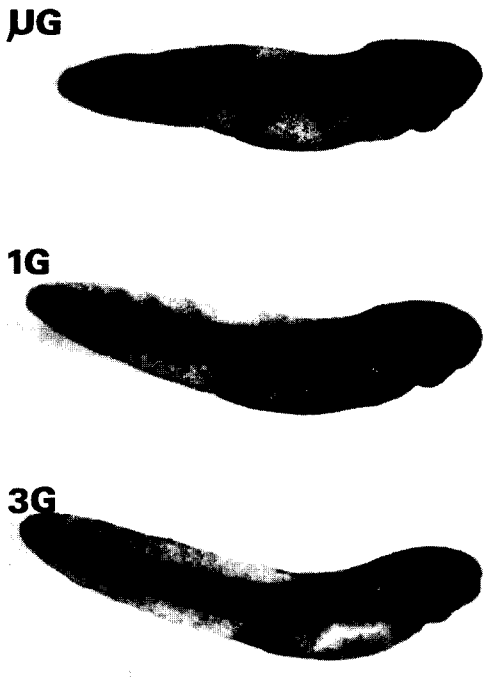

Fig. 7. Subtle dismorphogenesis along the anterior/posterior axis of novel gravitational-field-exposed larvae at tail fin circulation stage. μG larvae show a slightly anteriorization exemplified by increased head size, compared with 1G and 3G larvae.

에서도 유사한 결과를 초래한 것으로 나타났다 (Neff *et al.*, 1992). 중력장의 변화가 형태 형성에 영향을 미치는 사실로 미루어 무미 양서류의 초기 발생은 중력의 지배를 받는다고 할 수 있다.

초기 발생 단계에서 제3분열면의 위치는 중력의 크기에 의해 결정되었다. 그러나 양서류 배발생에 있어서 중력 의존적인 세포질 회전이나 난할면의 결정이 어떤 역할을 하는지는 명확하지 않다.

이상 중력장에서 난할면 위치가 변한다는 사실을 뒷받침하는 예로 원심분리한 *Rana* 배에서 원심력이 작용한 쪽의 할구가 반대쪽 할구에 비해 상당히 크며(Hertwig, 1899), 정속회전대(clinostat)에서 회전된 배에 제3분열면은 적도면 근처에 놓인다는 보고가 있다 (Dorfman and Cherdantzev, 1977). 한편 세포 분열 현상 자체가 세포질의 재배치를 유도하기도 하는데(Dorfman and Cherdantzev, 1977), 한 예로 난할면은 외곽 세포질을 배의 안쪽으로 이동시킨다(Danilchik and Denegre, 1991). 정상 상태에서 식물극에서 형성되는 분열면은 외곽 세포질을 중력에 거슬러 이동시킬 것이며, 중력의 크기는 세포질 이동의 양과 정도를 제한하는 것으로 생각된다. 즉 본 실험의 저중력 조건에서는 외곽 세포질의 이동이 증가되고 고중력 조건에서는 외곽 세포질의 이동이 감소되어 중력장 크기의 변화에 의한 난황 입자의 재배치가 일어나며, 이와 같은 난황 입자의 재배치가 제3분열면의 위치를 결정하는 것으로 보인다. 그러므로 양서류 난은 지구 중력 조건에서 안정된 난황 분포와 난할 양상을 갖도록 진화된 것으로 생각된다.

횡분열면의 위치를 결정하는 난황의 중력 의존적 분포는 원구상순부의 위치에도 영향을 미쳤다. Dale와 Slack(1987)은 두번째 횡분열인 제5분열과 원구상순부의 위치 사이의 관계에 대해 보고한 바 있다. 횡분열면과 원구상순부 위치사이의 관계를 명확히 하기위해서는 외곽세포질과 횡분열면의 표지를 통한 위치의 추적이 요구된다.

양서류난의 형태 형성 과정에 있어서 개체간의 차이나 batch별 차이는 주목할 만하며, 이러한 차이는 수정란에 존재하는 세포골격구조 차이에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 개체간 또는 batch 간의 차이는 발생이 진행됨에 따라 조절되며, 또한 인위적으로 분열면의 방향을 변화시킨 후 배양한 배도 정상적인 개체로 발생한다(Masho, 1988). 정상 상태에서 이루어지는 조절 기작은 이상 중력으로 유도된 난할면의 차이도 극복하게 한다. 즉 포배기에 동물극 정단 세포층 수는 저중력 상태의 배에서는 크게 증가하고 고중력 상태의 배에서는 감소하는 경향을 보였는데 낭배기에 이르면 정상배와 비슷한 수준으로 조절이 일어났다(그림 4). 그러한 조절은 세포의 이동과 분열에 의해 이루어진다(Keller, 1980). 즉 포배기의 동물극 정단 세포층은 발생이 진행됨에 따라 세포분열에 의하여 세포수가 증가하는 동시에 세포

들의 운동으로 얇은 층으로 정돈되어 낭배기에는 일정한 세포층을 보유한다. 그러나 이와같은 세포의 운동은 중력장의 변화에 영향을 받지 않았다.

이상 중력장은 발생 속도에도 영향을 미치는데 μG배의 경우 발생 속도는 약간 증가했으며 3G배의 경우에는 감소했다(그림 6). 발생속도는 개체 간의 차이가 크며 이것은 배의 유전적 특성으로 생각된다. 정상배에서 낭배기까지의 발생시간은 세포주기의 횟수에 의해 결정된다 (Satoh, 1977). 아마도 이상 중력장에서 배양된 배는 동식물반구에 위치한 할구의 핵-세포질 비율의 변화로 인해 중기포배전이기의 시간과 낭배시작 시기가 변하는 것으로 보인다. 이러한 가능성을 조사하기 위해 중기포배전이기와 낭배의 시작에 대한 분자적 수준의 조사가 요구되며, 중기포배전이기 이후나, 낭배시기에 일시적으로 표현되는 GS-17(Krieg and Melton, 1985)과 Goosecoid(Blumberg *et al.*, 1991) 같은 유전자를 이용하여 유전자의 발현시기를 조사하는 연구가 진행 중에 있다.

이상 중력 조건은 낭배 이후의 형태형성에도 영향을 미치는 것으로 보인다. μG조건에서 tail fin circulation 시기의 배는 1G와 비교할 때 머리부위가 확대되며, 3G 경우에는 축소되는 것이 관찰되었다. 저중력 조건에서 머리부위의 확대는 우주공간에서의 실험으로도 관찰된 바 있다(Young and Tremor, 1968). 이와 같은 형태적 변화가 초기배의 기관 형성의 변화에 의한 것인지 세포질의 재배치에 의한 것인지는 명확하지 않다.

인용문헌

Blumberg, B., C.V.E. Wright, E.M. DeRobertis, and K. W.Y. Cho, 1991. Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos, *Science* **253:** 194-196.

Chung, H.-M. and G.M. Malacinski, 1980. Establishment of the dorso/ventral polarity of the amphibian embryos: Use of ultraviolet irradiation and egg rotation as probes. *Develop. Biol.* **80:** 120-123.

Chung, H.-M. and G.M. Malacinski, 1982. Pattern formation during early amphibian development: Embryogenesis in inverted anuran and urodele eggs. *Develop. Biol.* **93:** 444-452.

Chung, H.-M. and P.-L. Han, 1984. Effect of gravity perturbation on the axis specification in the egg of *Xenopus laevis*. *Kor. J. Zool.* **21:** 127-136.

Dale, L. and J.M.W. Slack, 1987. Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* **99:** 527-551.

Danilchik, M.V. and J.M. Denegre, 1991. Deep cytoplasmic rearrangements during early development in *Xenopus laevis*. *Development* **111:** 845-856.

Dorfman, J.G. and V.G. Cherdantzev, 1977. Strukture morfogeneticheskikh divizheniy gastrulyatsii u beskhvostykh amfibiy. Soobshcheniye I. Destabilizatsiya ooplazmaticheskoy segvegatsii i drobleniya pod deystviyem klinostatirovaniya. *Ontogenez* **8:** 238-249.

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.

Hamburger, V., 1960. A manual of experimental embryology, University of Chicago Press.

Hara, K., P. Tydeman, and R.T.M. Hengst, 1977. Cinematographic observations of post-fertilization waves (PFW) on the zygote of *Xenopus laevis*. *Wilhelm Roux Arch.* **181:** 189-192.

Hertwig, O., 1899. Beitrage zur experimentellen Morphologie und Entwicklungsgeschichte. IV. Uber eninige durch Centrifugalkraft in der Entwicklung des Froscheies hervorgerufene veranderungen. *Arch. mikrosk. Anat.* **53:** 415-443.

Keller, R.E., 1980. The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.* **60:** 201-234.

Krieg, P.A. and D.A. Melton, 1985. Developmental regulation of gastrula-specific gene injected into fertilized *Xenopus* eggs. *EMBO J.* **4:** 3463-3471.

Masho, R., 1988. Fates of animal-dorsal blastomeres of eight-cell stage *Xenopus* embryos vary according to the specific patterns of the third cleavage plane. *Develop. Growth and Differ.* **30:** 347-359.

Moody, S.A. and K.J. Kline, 1990. Segregation of fate during cleavage of frog (*Xenopus laevis*) blastomeres. *Anat. Embryol.* **182:** 347-362.

Neff, A.W., G.M. Malacinski and H.-M. Chung, 1985. Microgravity simulation as a probe for understanding early *Xenopus* pattern specification. *J. Embryol. exp. Morph.* **89:** 259-274.

Neff, A.W., H. Yokoda, H.M. Chung, M. Wakahara, and G.M. Malacinski, 1992. Early amphibian (anuran)

morphogenesis is sensitive to novel gravitational fields. *Develop. Biol.* **154:** *in press.*

Satoh, N., 1977. Timing mechanisms in early embryonic development. *Differentiation* **22:** 156-163.

Scharf, S.R. and J.C. Gerhart, 1980. Determination of the dorsal-ventral axis in eggs of *Xenopus laevis*: Complete rescue in UV-impaired eggs by oblique orientation before first cleavage. *Develop. Biol.* **79:** 181-198.

Ubbels, G.A., K. Hara, C.H. Koster, and M.W. Kirschner, 1983. Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsal-ventral axis in *Xenopus laevis* eggs. *J. Embryol. exp. Morph.* **77:** 15-37.

Vincent, J.-P. and J.C. Gerhart, 1987. Subcortical rotation in *Xenopus* eggs: An early step in embryonic axis specification. *Develop. Biol.* **123:** 526-539.

Young, R.S. and J.W. Tremer, 1968. Weightlessness and the developing frog egg. *Life Sci. Space Res.* **6:** 88-94.

(Accepted August 31, 1992)

The Effect of Novel Gravitational Fields on Early Amphibian Morphogenesis

Eun-Jung Lee and Hae-Moon Chung (Department of Biology Education, College of Education, Seoul National University)

In this report an additional gravity effect that alters the size of early blastomeres is documented. Fertilized *Rana dybowskii* eggs were subjected to a range of novel gravitational fields. Microgravity (μG) was simulated by horizontal clinostat rotation and hypergravity (3G) was achieved by weak centrifugation. Novel gravitational field changed the location of the first horizontal cleavage furrow (third cleavage furrow). Compared to control, blastulae exposed to microgravity had centralized blastocoels and an increased number of cell layers in the blastocoel roof. In contrast, blastulae exposed hypergravity had reduced cell layers in the animal cap. However, the number of cell layers in the animal cap regulates toward normal in both μG- and 3G- exposed embryos by gastrula stage. Changes of gravitational field also affected the rate of development to gastrulation and the position of dorsal lip formation. By the stage 22 (tail fin circulation), experimental tadpoles showed slight dismorphogenesis of the size of the head. In conclusion, morphogenesis of amphibian embryos can be modified by varying the strength of the gravitational field.