

동 · 물 · 학 · 논 · 단

## 척추 동물 다리의 발생과 재생 및 패턴형성



김 원 선

1972. 3~1979. 2 서울대 생물교육학과(학사)  
 1979. 3~1980. 7 서울대 대학원 생물교육학과(석사)  
 1980. 9~1985. 5 미국 일리노이주립대  
 발생·유전학과(박사)  
 1985. 6~1986. 7 미국 일리노이주립대  
 생화학과(Post-doc)  
 1986. 9~현재 서강대학교 이과대학 생물학과 교수

### 1. 척추 동물의 다리 구조와 발생

척추 동물의 다리는 기본적으로 유사한 구조를 보이며, 다리의 골격은 앞다리의 골격을 기준으로 했을 때, 주각(柱脚; stylopodium) 부위에 위치하는 상완골(上腕骨; humerus), 접합지(接合肢; zeugopodium) 부위에 위치하는 요골(橈骨; radius)과 척골(尺骨; ulna), 자가족(自家足; autopodium) 부위에 위치하는 수근골(手根骨; carpals), 중수골(中手骨; metacarpals), 및 지골(指骨; phalanges)로 구성되어 있다. 이들 각 골격 요소는 형태적으로 많은 차이를 보이며, 특히 자가족 골격 요소의 숫자는 종에 따라 많은 차이를 보인다. 그러나 이러한 차이들은 삼차원적인 다리의 패턴 형성(pattern formation)과정을 연구함에 있어 매우 유용한 지표로 사용되고 있다. 이 외에도 다리를 구성하는 다른 조직인 근육과 결합조직의 경우에도 부위별로 구조상 많은 차이를 보이고 있다.

척추 동물의 다리 발생은 flank mesoderm의

용기로 시작된다. 원래 flank의 전 지역은 다리 형성 능력을 지니고 있으나 아직 잘 밝혀져 있지 않은 신호에 의해 flank의 특정지역이 다리의 형성 능력을 지닌 'limb field'의 운명을 부여 받게 되는 것으로 보인다. 상기 추론은 여러 가지 조직의 이식 실험을 통해 내려지게 되었다. Limb field의 운명이 결정되는 시기는 유미 양서류의 경우 후기 낭배기와 신경관 형성기 사이이며, 닭의 경우에는 Hamburger-Hamilton stage 12-16(16-28 체절기)사이에 이루어진다. 다리의 발생에 있어 somite mesoderm은 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다. 왜냐하면 somite mesoderm이 결여되면 다리의 발생은 정지되기 때문이다.

조직학적 연구 결과에 의하면 대부분의 다리를 구성하는 조직은 limb bud의 후반부 반쪽으로부터 유래한다. 이러한 다리 발생과정에서 의문점의 하나는 언제 축(axis)의 결정이 이루어지는가 하는 것이다. 많은 이식 실험을 통해 도출된 결론은 유미 양서류의 경우 AP축(anterior-posterior axis, 前後位軸)은 다리의 위치가 확정되는 시기에, DV축(dorsal-ventral axis, 背腹位軸)은 limb bud가 식별되기 시작하는 시기인 'tailbud' 시기에 결정되는 것으로 보인다. 닭의 경우에는 AP축과 DV축의 결정이 Hamburger-Hamilton stage 15에 완료된다. 특히 닭의 경우 이러한 축 결정 과정에서 wingbud의 후반부에 위치하는 조직인 'zone of polarizing activity'(ZPA)는 AP축의 결정에 중요한 역할을 한다. 즉, ZPA를 wingbud의 앞부분에 이식하면 AP축의 복제 현상이 나타나며, 이러한 ZPA의 능력은 양막류 이상의 동물에서 공통적으로 발견된다. 또한, wingbud의 정단부를 따라 발달하는 외배엽성 조직인 apical ectodermal ridge(AER)은 PD축(proximal-distal axis, 近遠位軸)의 결정뿐만 아니라 ZPA와의 상호작용에

의해 AP축의 결정에 지대한 영향을 미친다(1).

## 2. 양서류 다리의 재생

한편, 유미양서류는 뛰어난 재생 능력을 보유하며, 그 범위는 단순한 조직의 재생을 벗어나 다리는 물론이고 턱, 눈, 척수 및 심장을 비롯한 내장 기관까지도 재생이 되는 것으로 보고되고 있다. 특히 다리의 재생시 나타나는 여러가지 현상은 전술한 다리의 발생시 나타나는 여러가지 현상과 매우 유사하므로 패턴 형성 연구의 모델 시스템으로 널리 이용되고 있다. 양서류 다리의 재생과정은 편의상 크게 3단계로 나누어 볼 수 있다. 첫번째 단계는 절단 후 바로 시작되는 wound healing 과정이다. 다리의 절단이 일어나면 절단면 상부에 위치하는 상피조직을 구성하는 세포들은 기존의 조직체계에서 이탈하여 이동을 시작하며 곧이어 분열을 개시한다. 이들 세포는 절단면을 점차 덮으면서 기존의 상피조직과는 매우 다른 여러층의 세포로 구성되는 상처상피조직(傷處上皮組織, wound epidermis)를 형성한다. 두번째 단계는 탈분화(脫分化, dedifferentiation) 과정과 재생아(再生芽, blastema) 형성 과정이다. 탈분화는 절단면에 근접하는 다리 내부의 조직에서 일어나며 그 결과로 골격, 근육 및 기타 결체조직의 세포간 물질이 와해되고 조직을 구성하던 세포들은 초기 발생 시기의 형태와 유사한 모습을 띠게 된다. 또한 이 과정에서 hyaluronate와 같은 세포간 물질의 조성에도 변화가 일어나 그 조성이 배발생 시기의 경우와 유사하게 된다. 탈분화된 세포들은 곧 분열을 시작하며 이들은 상처 상피조직 아래에 모여 limb bud와 형태적으로 유사한 재생아를 형성한다. 재생아는 계속되는 세포분열에 의해 성장을 계속하며 후기에 이르러서는 DV축이 편평한 모습을 띄게 된다. 세번째 단계는 재분화(再分化, redifferentiation) 과정이다. 재분화 과정에서는 재생아의 내부에 탈분화된 세포들이 골격이 형성될 위치에 밀집되는 양상을 보이며 이어 근육의 전형적 모습도 서서히 나타나기 시작한다. 골격의 형성은 뒤이어 연골질의 축적과 함께 기존의 골격과 연속성을 유지

하는 형태적 특성을 보인다. 한편 재분화 과정은 PD축 상에서 근위부로 시작되며 점차 원위부로 진행된다(1,2).

재생이 비교적 잘 일어나는 유미 양서류의 경우와 그렇지 않은 동물들을 비교해 볼 때 나타나는 큰 차이점은 유미 양서류에서는 조직이나 기관의 손상이 일어났을 때 탈분화가 비교적 심하게 일어난다는 점이다. 상피조직, 근육, 뼈의 경우 예비세포(reserve cell)에 의해 제한적인 재생이 일어나는 경우도 일부 보고되어 있으나 체계적인 재생이 일어나기 위해서는 전반적인 탈분화가 필수적이며 이를 저해하면 재생이 정지된다(3). 또한 RA 처리에 따른 패턴 복제는 RA를 탈분화 시기에 처리했을 때 가장 강하게 일어나며, RA 처리는 탈분화를 심화한다. 이러한 관찰들은 탈분화가 패턴 형성에 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다(4).

## 3. 재생에 영향을 미치는 요인

양서류 다리의 재생은 조직간 상호 작용과 신경에 의해 큰 영향을 받는다. 이를 구분하여 간략히 정리하면 다음과 같다.

### 3. 1. 상피 조직과 중배엽성 조직의 상호작용

재생되는 다리의 정단부에 형성되는 정단 상피관(頂端上皮冠; apical epidermal cap; AEC)은 양서류 이상의 동물에서 다리의 발생시 관찰되는 AER에 비견될 수 있는 조직으로서 재생아의 형성과 더불어 상처 상피조직의 중층화에 의해 형성된다. 정단 상피관이 재생아의 성장과 패턴 과정에 필수적이라는 사실은 여러가지 조직 이식실험에 의해 잘 밝혀져 있다. 즉 재생아의 중배엽성 조직이 정단 상피관과 접촉하지 못하도록 인위적인 조작을 하면 재생은 정지된다(5). 또한 AEC의 유지에는 재생아 중배엽성 조직의 존재가 필수적이다. 일련의 실험 결과에 의하면 정단상피관은 재생아 세포의 세포주기를 조절하는 것으로 보인다(6). 즉, AEC는 재생아 세포가 G1 상태로 진입할 수 있는 요인을 생산하는 것으로 보인다. AEC가 재생아 세포를 세포분열 주기에 머물러 있도록하는한

재생아 세포는 분화의 방향으로 접어들지 않으며 계속 증식하게 된다. 그러나 AEC로 부터 유래하는 신호의 유효범위는 300 $\mu$ m에 불과하며 이 범위를 벗어난 세포들은 분화의 길로 접어들게 된다. 아직 AEC로 부터 유래하는 신호의 정체는 확실히 밝혀져 있지 않으나 여러 실험 결과들을 종합해 볼 때 bFGF(FGF-2) 또는 이와 유사한 물질이 그와 같은 역할을 할 것으로 추정되고 있다(7). FGF의 역할은 재생아 세포의 분열을 촉진할 가능성외에도 재생아 세포가 탈분화된 상태로 유지되도록 하는 기능을 담당할 가능성도 있다. 또한 bFGF는 탈분화시 일어나는 조직의 와해에도 관여할 것으로 추측된다. 조직의 와해를 매개하는 collagenase는 일부 다른 시스템에서 FGF에 의해 그 발현이 증가됨이 알려져 있다(8).

### 3. 2. 신경과 증배엽성 조직의 상호작용

양서류의 경우 다리의 절단이 일어나면 신경 말단의 퇴화가 일어난다. 그러나 절단후 2~3일이 경과하면 상처상피조직은 감각신경에 의해 연결되며 재생아의 성장과 분화에 수반하여 운동신경도 재생된다. 신경의 재생에는 재생아로부터 생성되는 여러가지 neuronotrophic factor가 관여하는 것으로 보인다. 반면에 신경은 재생이 일어나기 위해서 꼭 필요한 요소로서 재생 초기 단계에 신경이 제거되면 재생이 정지되거나 일어나지 않는다(9). 그러나 재생아에서 보이는 이러한 신경의존적 현상은 혈관 형성이 완성되면 사라진다. 즉 이 시기가 지나면 재생아는 신경의존적 현상에서 벗어난다. 신경이 재생에 미치는 영향에 관한 여러 실험 결과들을 요약하면 다음과 같다. 신경은 재생아 세포의 분열을 촉진하며 특히 세포주기 중 DNA 합성과 G2/M의 전환에서 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다(10). 이외에도 신경을 제거하면 RNA와 단백질 합성이 저해되며, 세포의 미세 구조 및 collagen과 hyaluronate와 같은 세포간 물질의 조성에도 변화가 유발된다. 한편 재생에 영향을 미치는 신경 유래 물질은 현재 확실히 밝혀져 있지는 않으나 FGF 또는 glial growth factor (GGF)와 같은 성장요소 혹은 substance P와 같

은 물질이 *in vitro* 실험 결과에 비추어 볼 때 가능성이 높은 것으로 추정되고 있다. 이 외에도 내분비계로 방출되는 호르몬도 재생이 정상적으로 일어나기 위해서는 필수적임이 알려져 있다.

### 4. 다리의 패턴 형성

재생 과정에서 한가지 흥미로운 현상은 재생되는 부분이 항상 기존의 절단면 이하에 해당되는 부분이라는 점이다. 원위화(遠位化, distal transformation)현상이라고 불리우는 이러한 현상은 절단면 근접부에서 유래하는 재생아 세포들이 탈분화 과정 중에도 본래의 위치에 관한 특성을 유지하기 때문에 가능한 것으로 보이며, 많은 이식실험 결과들은 재생아 세포가 세가지 주축(PD, AP, DV축)에 관한 위치특성(位置特性, positional value)을 지니고 있음을 보여주고 있다. 따라서 다리 재생 시스템은 세포의 위치특성이 결정되는 메카니즘과 이의 실제화에 연구의 초점을 맞추고 있는 패턴 형성에 관한 연구를 하기에 매우 유리한 점을 지니고 있다. 패턴 형성에 관한 여러 학설 중 Wolpert의 위치정보(位置情報, positional information) 학설은 많은 사람에게 의해 지지를 받고 있다(11). 위치정보 학설은 발생 초기에 미분화 상태에 있으며 동질의 특성을 지니는 세포들로 구성되어 있는 장(場, field)에 위치정보로 작용하게 되는 미지의 물질인 형태형성소(形態形成素, morphogen)가 장의 특정 부위에서 만들어져 구배를 형성하면 장을 구성하는 세포들이 이 농도 구배를 인식하고, 이에 따라 각각의 세포는 자신이 처한 장(場) 내에서의 위치에 따라 분화의 방향을 결정하게 되어 결국 패턴의 형성이 일어난다는 것이다. 이 때 위치정보를 감지한 세포들은 비교적 안정된 세포의 고유 특성인 위치 특성을 획득하게 되며 따라서 위치특성은 개개의 세포 분화 방향의 결정은 물론 장내에 혼란이 일어났을 때 이를 원래의 상태로 되돌려 놓을 수 있는 근거가 되는 것으로 보여지고 있다. 양서류 다리의 절단시 탈분화에 의해 초기 발생 상태로 되돌아 간 세포들로부터 원위부에 해당되는 부위

만이 형성되는 현상은 바로 위치특성이 세포의 안정된 특성임을 단적으로 보여주는 것이며, 위치정보 확설에 입각한 패턴형성 기작의 규명을 위해서는 위치특성을 결정하는 물질의 규명이 진요하다고 할 수 있다. 이러한 방향의 연구에서 광을 드리우고 있는 물질 중 하나가 비타민 A 계열 화합물인 retinoic acid(RA)이다. RA는 정상 발생을 위한 필수적 물질의 하나이나 과량으로 존재하면 기형발생을 유발하기도 한다. 흥미로운 사실은 양서류 다리의 재생시 RA를 처리하면 근위부 구조의 복제를 초래하며 때로는 AP 및 DV축 상에서의 복제 현상도 나타난다는 점이다. 이와 더불어 RA는 재생중인 올챙이의 꼬리로부터 여러개의 뒷다리의 형성을 유발하는 현상을 보이며, 발생중인 닭의 wingbud에서는 AP축 상에서 패턴의 복제를 유발하기도 한다. 따라서 RA는 패턴형성의 기본 틀에 변화를 유발하는 것으로 추측되며, 이러한 관점에서 RA를 이용한 위치특성의 규명 전망은 매우 밝다고 할 수 있다(12).

### 5. 다리 패턴 형성의 분자적 기작

닭의 날개 패턴 형성에 대한 분자적 기작은 AP축의 경우 비교적 많이 알려져 있다. 닭의 날개 발생시 전술한 ZPA는 이식시 패턴 복제를 유발하는 것으로 보아 패턴을 결정하는 morphogen의 원천일 가능성이 매우 높은 것으로 간주되고 있다. 한 때 ZPA 이식시와 마찬가지로 패턴 복제를 유발하는 RA가 ZPA로부터 방출되는 morphogen일 것이라는 추측이 대두되었으나 그 후 수행된 일련의 실험은 이 가능성이 희박함을 보여 주었다. 한편 최근 수행된 몇몇 연구는 sonic hedgehog(shh)이 ZPA morphogen일 가능성을 강력히 시사하고 있다. hedgehog은 초파리 유생의 각 체절 후반부에서 발현되어 AP축 상에서 극성을 결정하는 것으로 알려져 있다. 이와 상동성을 보이는 유전자인 shh는 ZPA 세포에서만 발현되며, shh의 발현이 wingbud의 앞쪽에서 일어나도록 하면 그 부분이 ZPA의 특성을 발휘하고, ZPA에 의해 그 발현이 조절되는 Hox-D 11, 13 유전자의 발현이 shh의 조절

을 받는다는 사실은 그 가능성을 더욱 지지하고 있다. 한편 초파리의 발생 과정에서 hh에 의한 위치 특성 결정이 dpp와 같은 유전자의 발현을 통해 단계적으로 이루어 지는 것으로 보아 shh의 경우에도 이와 같은 과정에 의해 wingbud의 AP축 결정이 이루어 질 것으로 추정된다(13). 또한 ZPA와 AER의 활성이 상호보완적 관계에 있는 것으로 보아 shh의 발현이 bFGF의 발현에 영향을 미치고 이와 역의 관계도 성립하는 것으로 보인다(22).

다른 발생 시스템의 경우와 마찬가지로 Hox 유전자는 다리의 패턴 형성 과정에서도 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보여진다(14). 닭의 날개 발생시 HoxA-10, 11, 13의 발현 양상은 PD축을 따라 발현 영역에 구획성을 보이며, HoxD 9-13의 발현은 AP축과 PD축이 복합된 구획을 따라 발현 영역이 정해지는 양상을 보인다. 이 외에도 HoxB-5 및 HoxC-6 유전자의 발현이 어깨뼈가 형성되는 위치인 전근위부(anteroproximal region)에서 집중적으로 나타난다는 보고도 있다.

따라서 Hox 유전자 발현의 조합은 특정 위치에서의 세포의 운명을 결정하고 이에 따라 wingbud의 각 위치에서 독특한 패턴의 형성이 가능케되는 것으로 추정된다. 이 외에도 세포막의 당단백질 유전자인 AV-1, MHox/Phox 계열 유전자인 Prx-1, 성장요소 유전자의 하나로 보이는 Wnt-5, 초파리의 msh 유전자와 동일 계열 유전자로 보이는 Msx-1, Msx-2 등의 발현도 그 발현 위치와 시기로 보아 패턴 형성과 밀접히 연관되어 있는 것으로 판단되고 있다. 흥미로운 사실은 패턴 변화를 유발하는 RA가 전술한 Hox 유전자를 비롯한 패턴 형성 관여 유전자 발현에 변화를 유발한다는 점이다. 이와 같은 현상은 앞서 밝힌 바와 같이 패턴 형성 연구에 있어 RA의 효용성을 보여주는 좋은 예이다.

한편 앞서 기술한 바와 같이 재생아는 그 자체가 하나의 독립적 발생 시스템으로서 패턴 형성 연구를 하기에 매우 적합한 시스템이다. 유미 양서류의 경우에도 Hox 유전자의 발현에 대한 연구가 수행되고 있으며 현재까지 보고된 결

과는 다음과 같다. 즉, HoxC-6 의 경우 PD 축 상에서 그 발현은 근위부에서 더 강하게 나타나며 HoxD-10의 경우에도 그 발현 양상이 HoxC-6의 경우와 유사하다. 특히 HoxD-10의 경우 RA에 의해 그 발현이 2~3배 증가하며 이러한 변화는 패턴의 복제를 유발하는 RA 처리 시기와 깊은 상관 관계를 보인다. HoxD-11의 경우에도 근위부에서의 발현은 원위부에 비해 3~5배 높게 나타난다. 그러나 HoxD-11의 경우 RA 처리는 유전자 발현에 별 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다. 이러한 Hox 유전자 계열의 발현 양상을 종합해 볼 때 재생 시스템에서도 Hox 유전자의 발현은 패턴 형성과 밀접히 연관되어 있는 것으로 추정된다(15).

세포 수준에서 재생아 세포는 위치에 따른 접착성(adhesion property)에 차이를 보인다. 즉, PD 축의 서로 다른 위치에서 유래한 재생아 세포를 인접시키면 근위부 세포가 원위부 세포를 감싸게 되며 이러한 현상은 원위부 세포의 상대적 접착성이 근위부 세포에서 보다 더 크기 때문에 나타나는 것으로 해석되고 있다. 또한 서로 다른 위치에서 유래한 재생아를 재생되고 있는 제3의 재생아에 이식하면 재생아의 성장에 따라 이식된 재생아가 이동하다가 자신이 유래한 위치와 동일한 위치에 도달하면 이동이 정지된다. 이러한 현상들은 재생아 세포의 세포 수준에서의 위치 특성이 세포 표면의 접착성과 연계되어 있음을 시사하며, RA를 이용한 연구 결과는 RA가 세포 표면의 접착성에 변화를 유발함을 보여주고 있다(16). 위의 실험적 결과들을 종합해 볼 때 Hox 유전자의 발현은 세포 표면 특성을 조절하여 패턴 형성의 청사진을 확립하는 것으로 추정할 수 있다. 따라서 재생 시스템을 모델로 한 패턴 형성 연구에서 해결해야 할 문제는 Hox 유전자의 발현과 세포 표면 특성의 결정 사이에 일어나는 분자 수준에서의 과정을 밝히는 것으로 귀결된다.

본인의 연구실에서 수행된 일련의 연구 결과는 유미 양서류의 다리 재생 과정에서 탈분화 기간이 패턴 형성의 전초 단계로서 매우 중요함을 시사하고 있다. 즉, RA 처리에 의해 유발되는 패턴 복제와 탈분화의 정도에는 높은 정(正)

의 상관관계가 존재한다. 이러한 결론은 유미양서류 다리의 재생을 대상으로 하여 수행된 조직학적 연구와 생화학적 연구 결과에 의해 뒷받침되고 있다(17). 그 연구 결과를 요약하면 탈분화 시기에 그 발현이 증가되는 lysosomal acid phosphatase의 발현이 RA 처리에 의해 현격히 증가하며, 세포간 물질의 변화를 매개하는 것으로 보이는 일련의 단백질 분해효소의 경우에도 유사한 양상이 나타난다. 또한 탈분화 시기 특이적 단백질 발현 양상도 RA 처리시 그 정도가 심화된다. 탈분화 자체가 재생아를 형성할 세포의 위치 특성에 직접적인 변화를 유발하는지의 여부는 아직 불명확한 상태이나 최소한 탈분화 상태가 RA 처리에 따른 위치 특성 변화가 일어나기 위해서는 반드시 필요한 것으로 보여진다.

앞으로도 척추동물 다리의 발생과 재생을 모델로 한 패턴 형성의 메카니즘 규명에는 많은 연구가 필요할 것으로 보이지만 이러한 패턴 형성에 관한 연구는 생명 현상에 대한 기본적인 이해를 가능케 할 뿐만 아니라 궁극적으로는 선천성 기형의 방지, 조직 혹은 기관 손상을 원래의 상태로 복구시키기 위한 방안을 강구함에 있어 매우 유용한 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 기대된다.

#### 참고문헌

1. Stocum, D.L. 1995. Wound repair, regeneration, and artificial tissues, R.G. Landes Co., Austin, Texas, pp.230.
2. Wallace, H. 1981. Vertebrate limb regeneration, John Wiley & Sons, New York, pp.276.
3. Tassava, R.A. and D.J. Garling, 1979. *J. Exp. Zool.* 208:97-110.
4. Kim, W.-S. and D. L. Stocum, 1986. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195:243-251.
5. Goss, R.J. 1956. *Anat. Rec.* 126:15-27.
6. Tassava, R.A. and A.L. Mescher, 1975. *Differentiation* 4:23-24.
7. Taylor, G.P., Anderson R., Reginelli A.D. and others, 1994. *Dev. Biol.* 163:282-284.
8. Edwards, D.R., Murphy G., Reynolds J.J. and

- others, 1987. *EMBO J.* 6:1899-1904.
9. Singer, M. and J. Geraudie, 1991. In: A history of regeneration research (Dinsmore C. ed.), Cambridge, Cambridge Univ. P., pp. 101-112.
10. Tassava, R.A. and W. McCullough, 1978. *Am. Zool.* 18:843-854.
11. Wolpert, L. 1994. *Dev. Gen.* 15:485-490.
12. Stocum, D.L. 1991. *Cell*, 67:5-8.
13. Smith, J.C. 1994. *Cell*, 76:193-196.
14. Hayamizu, T.F., Wanek N., Taylor G. and others, 1994. *Dev Biol.* 161:504-512.
15. Simon, H.-G. and C.J. Tabin, 1993. *Development*, 111:1397-1407.
16. Crawford, K. and D.L. Stocum, 1988. *Development*, 102: 687-698.
17. Ju, B.-G. and W.-S. Kim, 1994. *Dev. Dyn.* 199:253-267.