

Xenopus 동물극의 분리배양에서 Activin A와 IGF-1의 복합처리에 의한 前腎의 분화와 IGF-1 高濃度の 효과

정선우[†] · 진정호 · 윤춘식*

창원대학교 자연과학대학 생물학과
*생명공학연구소 분자세포생물학연구부

Pronephros Induction by Combined-dose of Activin A and IGF-1, and High-dose Effect of IGF-1 in *Xenopus* Animal Cap Assay

Seon-Woo Cheong[†], Jung-Hyo Jin, and Chun-Sik Yoon*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Kyungnam 641-773, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Abstract

The induction of nephric duct from *Xenopus* presumptive ectoderm(animal cap) was studied and the high-dose effect of IGF-1 was investigated. Activin A induce various organs from cultured animal cap explants and the effects are time and dose-dependent. On the induction of nephric duct, the combined-dose of activin A and retinoic acid was very efficient method in reference study. In present study, we used IGF-1 as well as activin A as a combined growth factor. The concentration ranges of growth factors were activin A 100ng/ml and IGF-1 0-500ng/ml. Explants were cultured in combined solution for 3days to the normal embryo arrives at st. 43. In general, when the explant was cultured in high concentration(100ng/ml) of activin A, it was destroyed, however, nephric duct and other tissues were differentiated by adding IGF-1. In addition, eye induction by adding IGF-1 500ng/ml to activin A 1- 100 ng/ml solution was studied. The low concentration of activin A(1ng/ml) have blood-like cell inducing effect and the explant was balloon-shaped, however, the high dose combination with IGF-1 extended the range of eye inductive concentration of activin A.

Key words : *Xenopus*, Animal cap assay, IGF-1

서 론

양서류는 난이 개체발생연구에 매우 유리한 모델동물이다. 이는 난이 커서 쉽게 조작할 수 있기 때문이며 최근

에는 *Xenopus laevis*를 이용한 실험이 널리 행하여지고 있다¹⁷⁾. *Xenopus*는 3년 정도가 되면 성적으로 완전히 성숙하여 수정난을 얻어 낼 수가 있는데³⁾ 수정과 동시에 동-식물극을 중심으로 방사대칭이던 난이 정자 진입부가 복부 쪽으로

[†] Corresponding author

되면서 방사대칭성이 무너진다. 수정난은 부위별로 기관분화결정이 되어 있으며 포배강의 천정부위(animal cap = presumptive ectoderm)는 豫定表皮域 또는 豫定神經域으로서, 식물극에서 동물극쪽으로 전달되는 중배엽분화 신호를 받지 못하면, 즉 따로 분리되면 比定型表皮組織으로만 분화하게 된다. 이러한 동물극의 일부를 분리하여 성장인자들을 처리하지 않고 배양하면 正常胚가 특정조직이나 器官을 분화시키는 동안 分離片은 어떤 기관도 유도해 내지 못한다. 그러나 동물극분리편 고유의 형질을 바꾸어 예정표피역으로부터 특정기관을 유도해 내는 물질이 있는데 이러한 것을 形質轉換成長因子(Transforming Growth Factor)라고 하며, TGF- β superfamily에 대해 여러 동물을 대상으로 실험되어 오고 있다. 그 중 강력한 유도효과를 가지는 물질로 activin 을 들 수 있는데, 이들은 activin A, activin AB, activin B의 3종으로 나뉘며, 세포에 대한 효과의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 그 중 activin A는 동물극 분리편으로부터 復側中胚葉과 背側中胚葉을 모두 誘導하는 강력한 유도인자로 알려져 있으며 처리시간 및 농도에 따른 유도효과에 대한 연구는 *Xenopus*와 *Cynopus*를 대상으로 Asashima와 有泉高史²⁾에 의해 자세히 연구되어 있다. 즉, activin A를 0.1 - 1ng/ml의 저농도로 처리하면, 주로 血球樣세포와 약간의 근육이 발생하며 2차유도에 의해 신경조직이 유도되는 경우도 있다. 10 - 50ng/ml 농도처리에서는 근육과 척색 등 배측중배엽이 유도되며 100ng/ml 이상의 농도처리에서는 분리편이 파괴되어 배양이 되지 않는 경우가 대부분이다¹⁾. 그러나 Yoon²¹⁾ 등은 activin A의 일정농도 범위에서 耳囊이 낮은 비율로 분화됨을 보고 한 바 있다.

성장인자의 단일처리에 의한 효과는 동물극 분리배양실험에서 많은 물질에 대해 그 효과가 밝혀지고 있으나, 복합처리에 의한 효과에 대한 연구는 아직 많은 시도가 이루어지지 않고 있다. 성장인자의 복합처리를 하기 위해서는 기본적 기관유도능을 이끌어 내기 위해 activin을 반드시 처리해 주어야 하며 이는 본 연구에서 저자 등이 IGF-1의 단독처리로 확인하였다.

본 연구에서는 먼저 Asashima¹⁾의 activin A 농도별 단독처리에 의한 기관분화경향을 바탕으로 activin A 1 - 100ng/ml의 농도와 IGF-1 고농도(500ng/ml)와 조합하여 얻어지는 효과를 실험하였다. IGF-1은 간(Liver)에서

생산되어 많은 종류의 세포에 그 수용체가 분포되어 있으며¹⁴⁾ 세포막 관통영역을 가진 수용체에 의해 세포질 내외로 그 신호가 전달된다. 이는 모든 척추동물의 성장과 발달에 필요한 물질로서 70개의 아미노산중 57개의 아미노산이 척추동물에게는 공통적인, 매우 안정된 물질로 알려져 있다⁸⁾. IGF-1의 생물학적 작용은 많은 연구에 의해 알려져 있다. *in vitro* 에서는 인슐린과 비슷한 작용을 보여주지만, 생체내에서는 생리적 역할이 인슐린과 매우 다르다²²⁾. *Xenopus*에 대한 효과로는 Sadler와 Maller¹⁵⁾에 의하면, 0.3 - 1ng/ml 농도에서는 생체내에서 pospodiesterase를 자극하고, 세포주기에 관여하여 난세포의 성숙을 유도하게 된다^{4,7,11)}. 또한 성숙난에서의 IGF-1 수용체는 난의 표면에 존재하고⁵⁾, *Xenopus*의 연골성장에 관여하게 된다¹⁶⁾.

본 연구의 두 번째 목적은 activin A에 IGF-1을 첨가함으로써 腎管이 유도되는 경향을 파악하는 것이며 이는 Asashima 등이 동물극분리편을 activin A 10ng/ml와 retinoic acid 10^{-6} - 10^{-4} M의 농도로 복합처리했을 때 신관을 분화시킬 수 있었던 것과는 전혀 다른 물질에 의한 유도이다. *Xenopus* 정상배에서 신관의 분화는 그 첫단계가 st. 20-24 사이에 原腎管芽體가 형성되고 st. 21에 측중배엽, 체질의 복측이 약간 두꺼워져 前腎芽가 나타난다. 이어서 收集管은 관상의 분화과정을 st. 28에 거치며 st. 29~30에 內腔이 나타난다. st. 31에 나선형구조가 나타나고 이 때 신구가 처음으로 활동을 시작하지만 이 때 수집관의 내벽은 아직 두껍고 섬모가 없다. st. 34에 內腔이 커지고 완전한 前腎이 기능적이 된다¹⁹⁾. 한편 中腎이 몸의 약간 뒤쪽에서 발생하고 중신이 완전히 발생될 때 전신도 완전히 퇴화된다. 곧이어 변태가 일어나고 중신도 퇴화의 양상을 보이며 변태 후에는 중신의 재구성이 일어난다. st. 43에 중신원기가 뚜렷해지므로 이 때 뚜렷이 신관이 나타나는 것은 원신관이다^{12,23)}. 따라서 본 연구에서 나타나는 신관이 어느 정도의 발생단계에 와 있는지, 그리고 activin A와 IGF-1의 복합처리에 의해 신관이 분화되어 나오는 농도범위를 결정하는 것에도 의의가 있다.

재료 및 방법

Xenopus 초기배의 준비 및 동물극 분리배양
*Xenopus laevis*는 3년 이상 성숙된 암수개체를 (*Xenopus*

I : USA) 실험실에서 유지하면서 산란을 위해 암수 공히 HCG(human chorionic gonadotrophin)를 500-800 IU씩 주사하여 수정란을 얻고 젤리층은 3% cystein hydrochloride(pH 7.8)로 제거한 뒤에 멸균된 Steinberg 생리식염수(pH 7.4)로 세척한다. 멸균된 3% agar plate 위에서 st. 9의 난란을 선별하여 핀셋(watch maker's tweezers)으로 난막을 제거하고 전기분해한 텅스텐 니들로 동물극을 분리한 후 Steinberg 생리식염수에서 정상배가 st. 43에 도달할 때까지 20°C에서 배양하고 이를 대조구로 하였다. 처리구는 activin 처리 없이 IGF-1 단독처리를 1 - 500ng/ml까지 하였고, 이 외에 activin A 1~100ng/ml/ 0.1% BSA와 IGF-1, 1 - 500ng/ml의 농도를 조합하여 처리한 뒤 역시 정상배가 stage 43에 이를 때까지 배양하였다. 배양에 사용하는 표면처리 안된 멸균제 96well plate를 사용하였으며 동물극분리편은 1well당 1개씩, 대조구 및 처리배양액은 120μl씩 분주하였다. 발생단계는 Nieuwkoop 과 Faber¹³⁾를 따랐다.

배양조직의 동정 및 기관분화 경향분석

St. 43에 이른 정상배와 대조구 및 처리구의 배양조직은 Bouin's solution에 3시간 고정된 뒤 70, 90, 100% ethanol로 탈수후 파라핀 포매하여 8μm 두께로 절편후 Hematoxylin-Eosin으로 염색 관찰하였으며 분화된 조직은 동정하여 농도조합에 따른 기관의 분화경향을 분석하였다. 또한 같은 배양조직내에 함께 분화할 가능성이 높은 기관들의 상관도를 평가하기 위해 SPSS프로그램을 이용하여 군집분석도 행하였다^{9,10,18)}. 이 때 case는 각 기관으로 두고 변수는 각 농도조합별 배양분리편 50개 표본에서 나타난 특정 기관의 有無로 두었다.

결 과

*Xenopus*의 정상배를 st. 43 까지 배양하면 중단면 관찰시 청낭과 눈이 잘 보이는 준위에서, 그리고 횡단면의 신경관, 척색, 내배엽이 관찰되는 준위에서 신관이 발달해 있는 것을 볼 수 있다. 신관은 체절의 전복부, 卵黃富内胚葉의 앞쪽인 동시에 심장의 위쪽에서 잘 보이게 되는데(Fig. 2), 신관조직의 특징은 많은 관상구조로 구성되어 있으며 각세포들의 핵은 원신관의 내강을 향하여 구심적으로 배치되어

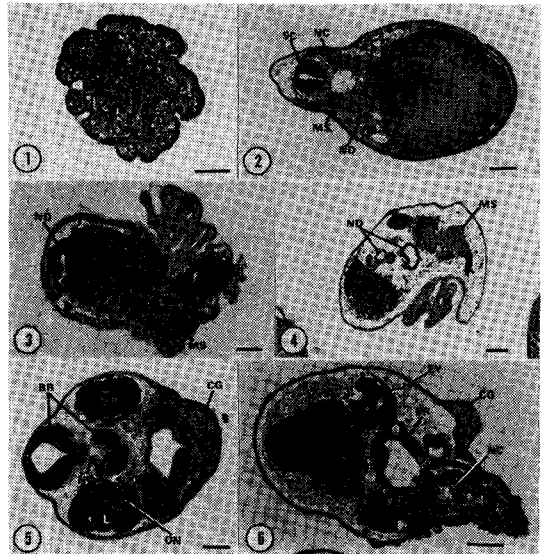


Fig. 1. Light micrograph showing atypical epithelium of animal cap explant cultured without activin A to st. 43. Paraffin section and HE stain.
 Fig. 2. Cross section showing the level of nephric duct (ND) of normal embryo at st. 43. Spinal cord (SC), notochord (NC) and muscle (MS) are seen at left side.
 Fig. 3 - 4. Nephric ducts (ND) are induced by combined dose at the concentration of activin A 100ng/ml and IGF-1, 1-100ng/ml. At fig. 3, white vacuoles of nephric ducts are rudimentary. MS : muscle
 Fig. 5. Cross section of normal embryo at st. 43 showing the level of eye including lens (L), optic nerve (ON). Brain (BR), notochord (NC), and cement gland (CG) are also seen.
 Fig. 6. Light micrograph showing eye (EY) induced by combined dose of activin A 1-100ng/ml and high dose of IGF-1 (500ng/ml). High dose of IGF-1 causes the extension of the range of activin A concentration inducing the eye. CG : cement gland BR : brain NC : notochord Bar : 100 μm

있다. 또한 핵의 바깥쪽 세포질에는 핵크기의 胞가 자리잡고 있다. 이 때의 신관은 발생시기상 原腎管에 해당한다. 배양액에 성장인자를 처리하지 않거나, IGF-1만 처리했을 때는 비정형표피조직만이 분화되고 그 외의 기관이나 조직

Table 1. Assay of animal cap explants cultured for 3days in the mixture of various concentration of activin A and high-dose of IGF-1(500ng/ml). A : activin A I : IGF-1(Inslin-like Growth Factor-1) AE : atypical epithelium EP : epithelium Ey : eye OV : otic vesicle IE : intracoelomic epithelium MC : mesenchyme CG : cement gland NC : notochord MC : muscle ND : nephric duct

Combination		No. of case	Differentiations of animal cap explants(%)									
Concentration ng/ml			AE	EP	EY	OV	IE	MC	CG	NC	MS	ND
AO	IO	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1	I500	13	25	100	31	15	31	100	31	7	38	0
A10	I500	22	0	100	32	0	0	64	50	64	45	0
A50	I500	19	0	100	26	0	0	5	26	21	37	0
A100	I500	20	10	100	20	0	0	10	45	60	60	0

Table 2. The range of combined concentration for differentiating the pronephros. The developmental trend on treatment of IGF-1 1 -500ng/ml without activin A, and with activin A 100ng/ml were compared.

Concentration ng/ml		IO	I1	I10	I50	I100	I500
No. of case		18	19	20	20	17	20
AO	%	0	0	0	0	0	0
No. of case		19	21	19	19	27	21
A100	%	destroyed	43	37	28	29	0

은 분화되지 않았다(Fig. 1). 그리고 activin A 100ng/ml의 농도에서 IGF-1을 1ng - 100ng/ml까지 복합처리 했을 경우 신관이 발생함을 볼 수 있었다(Table 2, Figs. 3, 4). 또한 어떤 배양분리편에서는 신관의 각 세포에 있는 胞가 아직 未發達한 상태에 있는 것도 있었다. 이러한 경우는 신관의 내강이 잘 발달 하지 않은 배양조직이 많았다. 또한 activin A 1 - 100ng/ml와 IGF-1 500ng/ml 처리했을 때 시멘트선이 높은 비율로 출현하고 눈이 잘 분화되어 나왔다. 어떤 배양조직에서는 수정체까지 분화되기도 하고 청낭과 함께 분화되어 나오기도 했다. 이때, 일반적으로 activin A 1ng/ml로 단독 처리하면 거의 血球樣細胞나 약간의 근육, 그리고 약간의 미분화간엽조직 정도가 분화되어 나오는 경향을 보이지만, IGF-1 500ng/ml 첨가에 의해 activin A 1ng 농도에서도 정상배와 유사한(Fig. 5) 신경조직과 눈이 분화되어 나오는 결과를 얻었다(Table 1, Fig. 6). Activin 10ng/ml 처리에서는 단독처리가 근육과 척색을 주로 분화시키는 반면, IGF-1을 첨가함으로써 청낭과 눈이 분화되며 IGF-1의 1 - 50ng/ml농도에서는 청낭과 눈이 함께 분화

되어 나왔다. Activin 50ng/ml처리를 하면 척색이 주로 분화되어 나오는데 IGF 첨가에 의한 효과는 activin A 10ng/ml농도와 비슷하게 나타난다.

Activin A와 IGF-1의 혼합처리에 의한 동물극의 분리배양에서의 기관유도효과는 activin A 1 - 100ng/ml까지의 농도로 조합하여 혼합처리 배양했을 때 기존의 저자 등의 기초연구(unpublished data)에서 IGF-1, 0 - 100ng/ml 농도에 대하여 밝혀졌으며, 그 중 activin A100ng/ml와 IGF-1, 0 - 100ng/ml까지의 처리에 의한 기관유도 효과는 非定型表皮, 表皮, 눈, 聽囊, 未分化間葉組織, 시멘트腺, 脊索, 筋肉에 대하여 그 발생률이 실험되었다. 그러나 본 연구에서는 지금까지 밝혀지지 않은 신관의 유도율을 밝히게 되었다. 그 결과 activin A 1 - 50ng/ml에서는 IGF-1의 어떠한 농도조합에서도 신관이 발생되지 않았고 activin A100ng/ml와의 IGF-1농도 조합에서, 신관이 발생되었다. 즉, A100ng에 IGF-1을 처리하지 않았을 때는 배양조직이 파괴되는 것이 일반적이지만 IGF-1의 첨가에 의해 여러 가지 조직을 분화시키고 특히 신관을 분화시킨다. Activin A

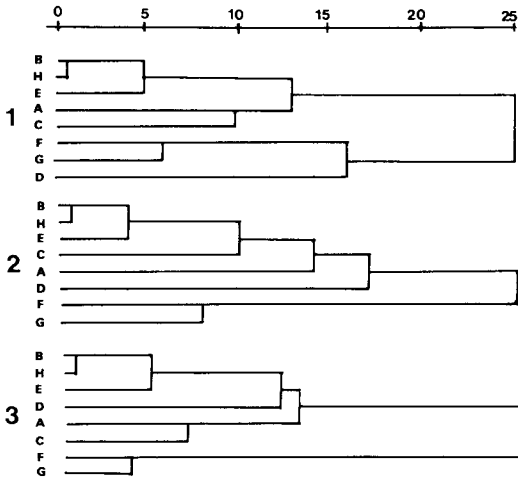


Fig. 7. Phenograms showing the relations among induced organs by activin A and IGF-1. Cases are induced organs and variables are explants cultured in the combined dose of activin A and IGF-1. Binary value is applied that is, 0(undeveloped) 1(developed).

- 1 : phenogram using Between-group method
- 2 : phenogram using Within-group method
- 3 : phenogram using Complete method
- A : atypical epithelium B : eye C : neural tube
- D : otic vesicle E : notochord F : muscle G : mesenchyme H : cement gland

100ng/ml 와 IGF-1, 1ng/ml 조합에서는 43%로 신관이 분화되어 나왔다. A100 I10 농도에서는 신관이 37%, A100 I50에서는 28%, A100 I100에서는 29%, A100 I500에서는 신관의 분화가 관찰되지 않았다. 그래서 신관은 동물극 분리배양중 A100 I1 농도에서 가장 높은 발생률을 보이며, A100 I100 까지 분화되고 있음을 보여주었다.

한편, activin A 1ng/ml와 IGF 500ng/ml 처리에 의한 조직분화 결과 눈이 31%, 청낭이 15%, 體腔内上皮가 31%, 未分化間葉組織이 100% 였으며 신관분화는 없었다. A10 I500농도조합에서는 눈이 32% 분화하였다. 또한 미분화간엽조직이 줄고 시멘트선과 척색의 발생이 감소하였다. 그리고 청낭이나 체강내상피는 전혀 관찰되지 않았으며 신관분화가 없었다. A50 I500 농도에서는 미분화간엽조직이 매우 낮은 비율로 나타났고 눈은 26% 분화되었다. A100 I500 의 농도에서는 신관은 없고 눈이 20%로 분화되었다.

신관의 분화는 activin A 100ng/ml일 때 IGF-1을 1ng/ml의 농도로 처리해 주었을 때 가장 높은 비율을 보였고 점차로 그 비율이 감소하여 A100 I500 일때는 신관이 분화하지 않았다.

IGF-1 과 activin A의 혼합처리에 의한 동물극 배양조직으로부터 분화되는 기관 및 조직들의 상관성을 검증하기 위해 전체 농도조합의 자료를 토대로 군집분석을 하였다. 그 결과, 눈과 시멘트선이 가장 밀접하게 상관되어 발생하는 것으로 나타났고, 그 다음으로는 그 두 기관에 청낭이 함께 발생할 가능성이 높은 것으로 나타났다. 그 외의 조직이나 기관중, 근육과 간엽조직은 눈, 시멘트선, 청낭이 함께 잘 발생하는 경향과는 달리 별개의 군으로 분리되므로, 근육과 간엽조직이 잘 발생된 배양분리편에서는 눈, 시멘트선, 청낭이 발생할 가능성이 상대적으로 낮다고 할 수 있다.

고 찰

IGF-1을 성장인자로 사용한 것은 이 성장인자가 인슐린과 유사한 구조를 가지고 *in vitro*에서 인슐린과 비슷한 기능을 보이기 때문에 동물극 분리편으로부터 肝 또는 脾臟을 유도해 낼 가능성이 있다는 것이 이유였으나 *Xenopus* 발생 초기의 체장에 결합하는 항체의 개발이 되지 않고 있고 간과 이자의 α -Fetoprotein에 반응하는 항체는 *Xenopus*의 성체조직에만 반응하기 때문에 의도한 기관의 유도를 확인하지 못하였다. 그러나 이러한 연구도중 IGF-1 이 난세포성숙에 관여하고 많은 척추동물의 기관발달 및 성장에 필수적이라는 점¹¹⁾에 근거를 두고 IGF-1을 사용한 동물극분리편에서의 기관유도 효과에 대한 실험을 저자 등이 행한바 있다(unpublished data). 기존의 저자 등의 연구에서는 모든 기관 및 조직에 대하여 다루어지지 못하였고 주로 감각기에 초점을 맞추었다. 그것은 감각기 조직의 동정이 비교적 쉽기 때문이며 초기 발생된 조직동정의 어려움 때문에 몇몇 기관에 대해서는 다루어지지 않았다. 많은 기관에 대해 여러 가지 단일클론항체나, *in situ* hybridization 에 의해 그 발생경향이 밝혀지기도 하지만 그렇지 못한 조직이나 기관은 여전히 완전한 발생자료를 제공해 주지 못하고 있다. 본 연구에서 밝혀진 초기 신관의 유도에 관한 연구는 분리편내에서 초기 신관의 조직학적 동정이 가능하게 되었고, 따라서 신관이 출현하는 성장인자의 농도범위를 결정하

게 된 것이다. 그러나 IGF-1을 단독 처리 할 때는 기관유도가 전혀 일어나지 않으므로 activin A의 기관유도능을 빌어 혼합처리 할 수 밖에 없다. Activin A의 기관유도능에 대하여는 이미 자세히 연구되어 있기 때문에 혼합 처리한 효과와 비교한다면 IGF-1이 처리됨으로 인한 효과를 찾아 낼 수 있게 된다. 역시 IGF-1을 함께 처리 했을 때는 activin A를 단독처리 할 때와 매우 다른 결과를 보여주었으나 기관 발생 경향은 activin A농도 의존적이었다. 즉, 저농도의 activin A에서는 배양조직의 내강이 크게 형성되고 卵黃富内胚葉이 적게 나타나지만 농도를 높일수록 분리편조직의 내강은 여러 가지 조직들로 채워지게 된다.

양서류의 신장은 크게 3가지의 변화를 겪게 된다. 발생 초기의 원신관과 st. 43부터의 중신의 발달로 st. 43근처에서 두 가지 신장을 동시에 갖게 되며 이때 뚜렷이 나타나는 것은 원신관이다. 이들은 발생초기에는 난황성분을 세포내외에 갖고 기관발생에 소모시키므로 초기 원신관의 내강은 좁고 세포질은 밀도가 높다. 그러나 기관발생이 진행됨에 따라 세포질내 난황성분은 모두 소모되고 신관의 특징적인 胞가 남게 된다. Activin A의 단독처리에서는 거의 유도되지 않는 신관은 본 연구에서 retinoic acid가 아닌 IGF-1에 의해서도 유도됨을 확인하였고 그 농도 범위도 결정되었다. 유도된 신관은 정상배의 신관과 정확히 그 발생 속도나 상태가 일치하는 것은 아니었으며 오히려 미발달 또는 미숙한 상태의 것이 많았다. 즉, 신관유도의 출발시점이 정상배보다 늦거나 발달속도가 느린 것으로 생각되었다. Weber 등⁶⁾은 HNF-1 α 가 활성화되면서 신관, 간 소화관등이 분화되어 나온다고 밝혔으며 본 실험의 성장인자들이 일련의 이러한 물질들을 활성화시켜 신관을 분화시키는 것으로 사료된다. 또한 activin A에 의해 背側中胚葉인 척색과 體節이 먼저 유도되고 이어서 IGF-1에 의해 체절로부터 신관의 유도를 자극한 것으로 생각된다. 더욱 정확한 초기신장의 동정, 즉 腎口나 腎管의 출현빈도를 별도로 측정하기 위해서는 3G8, 4A6 등의 단일클론항체를 사용한 면역조직화학적 실험²⁰⁾을 함께 하는 것이 바람직하나 이 것에 관한 연구는 현재 진행중이다. 이러한 기관유도연구는 앞으로 더 많은 성장인자와 더 많은 기관을 대상으로 할 수 있으며, 유도된 각 기관의 미세구조를 정상기관과 비교 제시함으로써 유도된 기관의 기능성도 검토하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

Xenopus 수정란의 동물극분리편에 IGF-1(Insulin-like Growth Factor-1)을 고농도로 처리해 주었을 때의 기관유도효과를 실험하였다. Activin A는 동물극 분리배양조직으로부터 다양한 기관을 분화시키며 이러한 효과는 처리 시간과 농도에 의존한다. 본 연구에서는 activin A 뿐만 아니라 IGF-1을 복합처리하여 특정 기관의 분화양상을 관찰하였다. Activin A는 100ng/ml의 농도로, IGF-1은 0-500 ng/ml의 범위로 조합 처리하였다. 분리편은 정상배가 st. 43에 이를 때까지 배양하였으며, 이때 activin A를 100 ng/ml의 고농도로 처리하면 조직이 파괴되는 것이 일반적이다. 그리고 신관의 발생에 대해서는 activin A와 retinoic acid의 복합처리가 매우 효과적인 방법으로 알려져 있으나, IGF-1의 첨가에 의해 신관을 비롯한 다른 조직들이 분화되었다. 또한, 눈의 분화는 activin A 1-100ng/ml와 IGF-1 500ng/ml의 농도범위에서 일어났다. Activin A의 저농도(1ng/ml)처리에서는 血球樣細胞가 분화하고 배양조직은 풍선처럼 부풀게되나 IGF-1의 첨가로 눈이 발생하게 되어 activin A상의 눈의 발생농도범위가 확대되었다.

참 고 문 헌

1. Arizumi, T., Moriya, N., Uchiyama, H., Asashima, M.: Concentration-dependent inducing activity of Activin A, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **200**, 230(1991).
2. Asashima, M., 有泉高史: ツメガエルの初期胚のづくりと遺傳子發現 pp. 78-88, *生物の科學, 遺伝豪華房, 遺傳*, (1994).
3. Deuchar, E. M.: The discovery of *Xenopus* in its natural habitats, pp. 1-20, *Xenopus*; The South African clawed frog, A Wiley-Interscience Publication, (1975).
4. Grigorescu, F., Baccara, M. T., Rouard, M., Renard, E.: Insulin and IGF-1 signaling in oocyte maturation, *Horm. Res.*, **42**(1-2), 55(1994).
5. Hainaut, P., Kowalski, A., Giorgetti, S., Baron, V., Van Obberghen, E.: Insulin and insulin-like-growth-factor-I(IGF-I) receptors in *Xenopus laevis* oocytes: Comparison with insulin receptors from liver and muscle, *Biochem. J.*, **273**(pt 3), 673(1991).
6. Weber, H., Holewa, B., Jones, E. A., Ryffel G. U.: Mesoderm and endoderm differentiation in animal

- cap explant : identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1alpha promotor, *Development*, 122(6), 1975 (1996).
7. Janicot, M., Flores-Riveros, J. R., Lane, M. D. : The insulin-like growth factor 1(IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-I, and IGF-2 in *Xenopus laevis* oocytes, *J. Biol. Chem.*, 266(15), 9382(1991).
 8. Kajimoto, Y., Rotwein, P. : Evolution of insulin-like growth factor I(IGF-I) : structure and expression of an IGF-I precursor from *Xenopus laevis*, *Mol. Endocrinol.*, 4(2), 217(1990).
 9. Karson, M. J. : Cluster analysis, pp. 249-260, Multivariate statistical methods, The Iowa State University Press, U.S.A.,(1982).
 10. Kendall, M. : Classification and clustering, pp. 31-46, Multivariate Analysis, 2nd ed., Charles Griffin & Company, London, (1980).
 11. LeRoith, D., Kavsan, VM., Koval, AP., Roberts, CT Jr. : Phylogeny of the insulin-like growth factors (IGFs) and receptors : a molecular approach, *Mol. Reprod. Dev.*, 35(4), 332(1993).
 12. Lynch, K., Fraser, SE. : Cell migration in the formation of the pronephric duct in *Xenopus laevis*, *Dev. Biol.*, 142(2), 283(1990).
 13. Nieuwkoop, P. D., Faber, J. : External and internal stage criteria in the development *Xenopus laevis*, pp. 162-188, Normal table of *Xenopus laevis*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam,(1956).
 14. Reinecke, M., Broger, I., Brun, R., Zapf, J., Maake, C. : Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I and II in the endocrine pancreas of birds, reptiles, and amphibia, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 100(3), 385(1995).
 15. Sadler, S. E., Maller, J. L. : In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *xenopus* oocytes. stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1, *J. Biol. Chem.*, 262(22), 10644(1987).
 16. Schneider, A., Hanke, W. : Hormonal control of the in vitro uptake of 「³⁵S」 sulfate by cartilage of *Xenopus laevis* tadpoles, *Comp. Biol. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 117(3), 317(1997).
 17. Smith, J. C. : Mesoderm induction and mesoderm-Inducing factors in early amphibian development, *The company of biologists development*, 105, 665 (1989).
 18. Sokal, R. R., Sneath, P. H. A. : Taxonomic structure, pp. 188-308, Numerical Taxonomy : the principles and practice of numerical classification, W. H. Freeman and Company. San Francisco, (1963).
 19. Tahara, T., Ogawa, K., Taniguchi, K. : Ontogeny of the Pronephros and Mesonephros in the south Africa Clawed frog, *Xenopus laevis* Daudin with special reference to the appearance and movement of the renin-immunopositive Cells, *Jikken Dobutsu.*, 42(4), 601(1993).
 20. Vize, P. D., Jones, E. A., Pfister, R. : Development of the *Xenopus* pronephric system, *Dev. Biol.*, 171(2), 531(1995).
 21. Yoon, C. S., Kim, H. D., Cheong, S. W. : Ultrastructural study of induced otic vesicle from isolated *Xenopus* presumptive ectoderm, *Korean J. Electron Microscopy*, 27(2), 189(1997).
 22. 久米又三 : ヒキガエルの發生段階表, pp. 178-195, 山本俊一, 脊椎動物發生學, 培風館, (1966).
 23. 播 穰治, 横野浩一, 春日雅人 : IGF-1 レセプター-キナーゼを介する情報傳達系, pp. 1008-1013, 細胞増殖因子の基礎と臨床, 共立出版株式会社, 蛋白質 核酸 酵素, (1991).