

정자융합에 의한 배수화

Takayoshi Ueda
宇都宮大學教育學部

유용어류의 생산 목적으로 염색체 조작이 도입된 이래 수많은 연구가 시도되어 실용화단계에 달한 것도 있다. 또 지금까지 축적된 연구 성과가 유전학 등에 관한 기초적인 문제해명에도 큰 공헌을 하고 있다.

개능단위로 조작할 수 있는 가능성을 가진 하나의 새로운 방법으로서 정자 융합법이 있다. 세포융합제로서 일반적인 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 처리한 정자와 정상적인 알을 수정시킨 결과 무지개송어에서 2정핵(精核) 3배체가 생성된 것으로부터 PEG가 정자간의 접촉 또는 융합에 유효하며, 접촉 또는 융합한 두 개의 정자가 동시에 난문(卵門)을 통과하여 두 개의 정핵이 난핵과 접합하는 것으로 여겨진다. 만약 2정자 수정이 높은 비율로 유도되면, 어류육종에 큰 공헌이 기대된다. 또 최근 고 pH·고Ca(염화칼슘을 고농도로 포함함, pH0으로 조정)이 정자간의 접합 또는 융합에 유효하다는 것이 인정되어, PEG와 같이 2정자 수정이 유도된 것과 같은 결과도 얻어지고 있다. 이러한 고Ca에 의한 처리법은 외래유전자를 세포로 도입하는 방법과 유사하여, 정자 또는 알에 외래유전자를 도입하는 방법으로 발전될 가능성도 가지고 있다.

이 장에서는 정자 융합법에 있어서 현재까지의 경과와 앞으로 전망에 대하여 논하겠다.

1. PEG에 의한 3배체의 유도

정자 융합법에 관한 연구는 무지개송어에 있어서 PEG로 처리한 정자와 정상적인 알을 수정시킨 결과, 3배체가 얻어진 것으로부터 시작하였으나. 먼저 Ueda등의 보고에 대하여 다시 한번 살펴보고자 한다.

방법은 다음과 같다. 1) 0.2~5ml의 무지개송어 정액을 원심관(직경16mm)에 넣고 2,000rpm으로 3분간 원심하여, 원심관의 밑부분에 정자를 응집한 상태에서 얇은 층으로 펼쳤다. 2) 대조구로서는, 원심 후 상등을 버리고 3ml의 A액(750mg 염화나트륨, 220mg 염화칼륨, 470mg HEPES를 100ml 증류수에 용해)에 정자를 부유시켜 정상적인 알에 수정시켰다(I군). 3) 한편, 처리군의 원심 후 상등을 버리고 PEG액(10g PEG 4,000을 10ml의 A액으로 용해)을 1ml 넣어 실온에서 1분간 정지한 후 2ml의 A액을 넣어 실온에서 2분간 정지하였다. 그 후 상등액을 버리고 A액으로 세 번 세정후 정자를 A액에 부유시켜 수정란에 수정시켰다(II군). 4) 암·수 어미의 핵형은 지느러미 배양법으로, 그리고 생산된 개체는 배체에서 직접법 또는 배양법에 의해 확인하였다.

암·수 어미의 핵형은 암컷어미는 $2n=60(44M \cdot SM+2ST+14A, NF=104)$, 수컷어미는 $2n=61$

(43M · SM+1ST +17A, NF=104)

(M : 중부형 염색체, SM : 차중부형 염색체, ST : 차단부형 염색체, A : 단부형 염색체, NF : nombre fundamental)이었다. 생산된 배의 염색체 구성은 표 1에 나타내었고, 표 중의 I은 무처리 군이고 II는 PEG처리군이다. PEG처리군 중에는 2배성 이에 3배성의 개체가 나타났다.

여기서 이 실험을 이용한 무지개송어는 일본 양식연구소 Nicko지소에서 사육중인 도날드슨계 이었으나, 이 계에는 핵형 상 큰 특성이 있으므로 여기에 대해 설명하기로 하겠다. 먼저 그 하나로서는 2N=60, 62, 63 및 64의 다형이 존재한다. 모든 이수체도 NF치가 104로 일정하고 소위 로버트슨형 변이에 의한 다형이다. 또 ST의 수에도 다형이 있고 2n-62~64의 다형에 관계없이 반드시 암컷에 두 개, 수컷에 한 개 존재한다. 그 ST가 X염색체이고 XX-XY형의 성 결정기구가 존재하는 것이라고 생각된다.

이러한 이수체는 모두 성숙하여 차세대를 남기지만 이수체의 배우자 염색체구성에 있어서도 명확하게 밝혀져 있다. 암컷 2n=61(43M · SM+2ST=16A, NF=104)과 수컷 2N=62(42M · SM+1ST+19A, NF=104)와의 교잡결과, 표2에 나타낸

것과 같은 핵형을 가진 차세대가 생기는 것으로부터 다음과 같은 것이 추정된다. 기본형이 2n=60(44M · SM+16ST · A, NF=104)이고 로버트슨형 변이에 관계하지 않는 상동염색체는 각각 절반으로 분리하여, 유전자 양을 보상(報償)하면서 배우자를 형성한다고 가정한다면, 로버트슨 변이에 관련한 염색체가 그림 1와 같이 분리된다. 즉, 61개는 30과 31개, 62개는 31과 31개만이 아니라, 30과 32개로 분리한다. 이것은 62개의 수컷에는 2개소의 로버트슨형 변이가 일어난 결과지만, 이것이 다른 상동대(相同對)에 일어나고 있는 것으로 추정된다. 더욱이 그 후, 다른 이수체간의 교잡에서 생긴 개체의 염색체 분석 및 유전적 불활성화 정자를 이용하여 난핵만으로 발생시킨 반수체 배의 염색체 분석이 행하여져 이수체에 의해 생긴 배우자의 염색체 구성이 명확해졌다. 즉, 2n=60의 성어로부터는 n=30의, 2n=61로부터는 n=30 또는 31의, 2n=62로부터는 n=32의 배우자가 형성된다. 어느 배우자도 NF값은 52이다. 이러한 배우자 형성 결과, 도날드슨계 중에서는 2n=60 ~ 64(모두 NF=104)의 이수체가 유지되고 있다. 도날드슨계의 이러한 성질을 알게 되면, 지느러미 배양법에 의해 죽이지 않고 성어의 염색

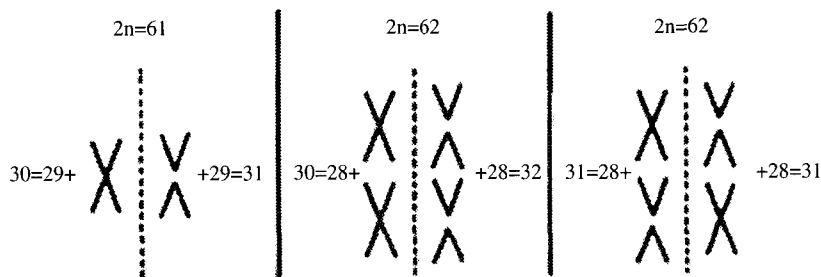


그림 1. 무지개 송어 이수체의 배우자 형성과정에 있어서의 염색체 분리
염색체의 그림은 로버트슨형 변이에 관련한 상동대(相同對)

표 1. PEG 실험에 의해 발생한 개체의 염색체 구성

실험군	개체번호	CN	M&SM	ST	A	NF
I	1	60	44	1	15	104
	2	60	44	2	14	104
	3	60	44	2	14	104
	4	60	44	2	14	104
	5	60	44	2	14	104
	6	60	44	2	14	104
	7	61	43	1	17	104
	8	61	43	1	17	104
	9	61	43	1	17	104
	10	61	43	1	17	104
	11	61	43	2	16	104
	12	61	43	2	16	104
	13	61	43	2	16	104
	14	61	43	2	16	104
	15	61	43	2	16	104
II	16	60	44	1	15	104
	17	60	44	1	15	104
	18	60	44	1	15	104
	19	60	44	1	15	104
	20	60	44	2	14	104
	21	60	44	2	14	104
	22	60	44	2	14	104
	23	60	44	2	14	104
	24	61	43	1	17	104
	25	61	43	1	17	104
	26	61	43	1	17	104
	27	61	43	1	17	104
	28	61	43	1	17	104
	29	61	43	2	16	104
	30	90	66	2	22	156
	31	91	65	2	24	156
	32	91	65	2	24	156
	33	91	65	3	23	156
	34	92	64	1	27	156
	35	92	64	2	26	156
	36	92	64	3	25	156

CN: 염색체의 수. M&SM: 중부형 및 차중부형 염색체의 수. ST: 차단부형 염색체의 수.
 A: 단부형 염색체의 수. NF: nombre fundamental.

표 2. 암컷 어미 2n=61과 수컷 어미 2n=62의 교잡에서 생긴 개체의 염색체 구성

개체번호	CN	M&SM	ST	A	NF
1	60	44	1	15	104
2	60	44	1	15	104
3	60	44	1	15	104
4	60	44	2	14	104
5	60	44	2	14	104
6	60	44	2	14	104
7	61	43	1	17	104
8	61	43	1	17	104
9	61	43	1	17	104
10	61	43	1	17	104
11	61	43	2	16	104
12	61	43	2	16	104
13	61	43	2	16	104
14	61	43	2	16	104
15	61	43	2	16	104
16	60	43	2	16	104
17	61	43	2	16	104
18	61	43	2	16	104
19	62	42	1	19	104
20	62	44	1	19	104
21	62	42	1	19	104
22	62	42	2	18	104
23	63	41	1	21	104
24	63	41	1	21	104
25	63	41	2	20	104

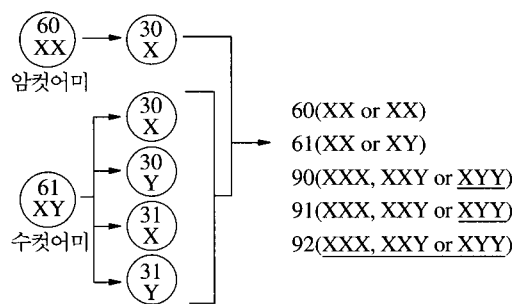


그림 2. 암컷어미 2n=60과 2n=61의 교잡에서 생길 수 있는 2배체 및 3배체의 염색체 수 및 성염색체 구성

체가 개체의 게놈유래가 추정 가능하여, 염색체 조작연구에 있어서 아주 유용한 재료로 여겨진다.

PEG실험에 의해 생산된 2배성 및 3배성 개체는 핵형 분석 결과 정상적인 2배체 및 3배체였다. 또 암컷 어미가 2n=60 수컷어미가 2n=61인 것에서, 이것들의 배우자로부터 될 가능성을 가진 2배체와 3배체의 염색체 구성은 그림 2에 나타난 것과 같다. 그 중 그림에 밑줄 친 염색체 구성은 수컷 게놈2와 암컷 게놈1을 조합한 것에서만 생

긴다. PEG 처리군 중에서 92개의 염색체를 가진 개체(XYY형도 포함)가 나타나, 두 개의 수컷 게놈으로부터 이루어진 3배체가 나타난 것으로 된다. 또 PEG처리 후 현미경하에서 두 개의 정자가 접착 또는 융합한 상이 관찰되는 것으로 보아 PEG처리에 의해 접착 또는 융합한 2정자가 동시에 난문을 통과하여 2정자 수정이 유도되었다고 하는 일련의 과정이 추정된다.

2. 유용어류 생산으로의 응용

만약 2정자수정이 높은 비율로 유도될 수 있으면, 어류 육종에 몇가지 응용이 가능하다. 먼저 3배체 생산을 들 수 있으나, 제 2극체 방출 저해에 의한 3배체와는 달리, 2계놈은 정액에서 유래하는데, 예를 들면 2종의 정자를 융합시켜 다른 종의 알에 접목시키면 3계놈 모두가 다른 종에서 유래되는 이질 3배체를 얻을 수 있다. (2) 난핵을 δ 선 등에 의해 유전적으로 불활성화된 후 2정자 수정을 시키면, 웅성발생 2배체를 얻을 수 있다. (3) 2 정자수정에 의한 3배체에 제 2극체 방출저지처리를 하면, 4배체를 얻을 수 있다. (4) 융합된 2정자중 한 쪽은 운동능력을 가질 필요가 없고, 일반적인 핵이라도 가능하므로, 핵이식으로 발전시킬 수 있는 가능성이 있다. 이것은 유전적으로 불활성화된 정자가 핵 운반 역할을 가져 자외선 등으로 유전적으로 불활성화된 정자에 이식하려고 하는 핵을 융합시킨 후에 수정시켜 핵을 알의 내부에 넣으려고 하는 시도이다. 이 원리를 기초로 낮은 확률이지만 운동정지 정자 핵을 발생시킨 예가 무지개 송어에서 보고되었다. 동결정자에 있어서 운동성을 잃어 수정할 수 없는 경우가 있으나, 이와 같은 냉동정자의 수정 능력 회복을

도울 수 있는 가능성 있다. (5) 더욱 발전시키면 외래 유전자 도입 응용도 생각할 수 있다. 불활성화된 정자에 외래 유전자를 도입한 후 여기에 정상 정자를 융합하여 알에 접목시킬 수 있을 것으로 기대된다. 핵이식이나 외래 유전자 도입에 있어서도, manipulator를 이용한 microinjection법과는 달리, 알에 손상이 적은 것은 이 방법의 큰 장점이다. 그러나 어느 것이나 결과적으로 가능성의 단계에 불과하다.

실용화하기 위해서는 우선 접착 또는 융합률이 낮은 것, PEG처리를 위해서는 두개의 정자가 융합한 것만을 선택하여야 하는 방책이 필요하지만, cell sorter를 이용하는 것에 의해 이 가능성이 금붕어 정자에서 시사되어졌다. 그러나 PEG에 의한 처리법은 아직 확립되어 졌다고는 할 수 없고, 높은 접착 또는 융합률이 얻어지지 않고 있다. 최근 고pH·고Ca이 정자간의 접착 또는 융합에 유효하고 PEG보다도 안정적으로 높은 접착 또는 융합률을 가질 수 있다고 한다(처리액의 pH를 5, 8, 10으로 변화시킨 후의 실험에 있어서 접착 또는 융합률의 pH에 의한 차이는 나타나지 않았다) 또 수정 후의 생존율도 PEG 처리에 비해 양호하며 PEG와 같이 2정자수정이 유도되어지는 것 같다는 결과도 보고되고 있다.

3. 정자 또는 알에의 외래 유전자 도입

외래 유전자 도입에 의한 유용어류 생산의 시도가 시작되고 있으나, microinjection법에는 어려운 점도 많은 것 같다. 흥미 깊은 것은 고Ca에 의한 처리법은 세포에 외래 유전자를 도입하는 일반적인 방법과 유사하다. 정자 및 알도 하나의 세포이기 때문에, 정자 또는 알에 외래 유전자를

표 3. 고칼슘 처리가 생존율에 미치는 영향

실험군	고 칼슘 처리(분)				발안기의 생존율(%)
	정 자	미수정란	수정란	혼 합	
I	---	---	---	---	58.7
	3	---	---	---	27.3
	10	---	---	---	15.1
	20	---	---	---	7.2
II	---	---	---	---	79.4
	---	3	---	---	53.9
	---	10	---	---	49.4
	---	20	---	---	39.5
III	---	---	---	---	29.4
	---	---	20	---	14.7
IV	---	---	---	---	79.0
	---	---	---	5	78.4
	---	---	---	10	80.1

---: 무처리, 실험 I~III에 이용한 고 칼슘액의 pH는 10으로, 실험 IV에는 8로 조절

도입하여 transgenic 어류를 만들 수 있는 가능성도 생각되어진다. 정자 또는 미수정란에 외래유전자를 도입 후 수정 시키는 방법 및 수정란에 외래유전자를 도입 방법이 있을 수 있다. 하지만, 유전자 도입률이 낮을 것으로 예상되어지기 때문에 생존율이 낮아지는 것을 막는 대책 마련이 불가피하고, 도입방법과 함께 도입시기도 검토되어야만 할 것이다. 표 3은 발안기에 고Ca처리를 하여 생존율에 미치는 영향을 본 것이다. 정자에 처리하여 정상적인 알과 수정시킨 것은 처리 시간을 길게 하면 생존율도 낮아져, 20분간 처리한 것에는 7.2%까지 내려갔다(I 군). 미수정란에 처리하여 정상정자와 수정시킨 것에도 처리시간과 함께 생존율은 낮아졌다(II 군). 또 정상수정 후 10분에 처리한 것 역시 생존율 저하가 나타났다

(III 군). 이 수정란에의 처리에 있어서 발안배 염색체를 확인한 결과, 처리에 따라 3배체가 증가하여, 고pH·고Ca에 제 2극체 방출저해작용이 있는 것으로 추정되어진 점도 흥미롭다.

더욱이 알과 정자를 혼합하여 고Ca처리 후 흡수시킨 군에는 대조군과 같은 정도의 생존율이 나타났다(IV 군). 난소액 중에서 정자가 운동하는 것은 관찰되었으나, 혼합한 단계에서 정자가 알의 어디에 도달해 있는가는 명확하지 않다. 혼합한 상태에서 고Ca에 의한 정자 융합효과가 역할을 하고 있는가, 정자 또는 알에의 외래 유전자 도입효과가 역할을 하고 있는가 등에 대해서는 조속한 해명이 필요하다.

외래유전자 도입까지 포함하여 정자 융합법에는 많은 문제가 남겨져 있다. 그러나 앞으로의

검토에 따라 어류육종에 있어서 아주 큰 수단이 될 것으로 여겨진다. 또 이것들의 검토를 통하여 수정기구, 세포융합기구 또는 유전자 조절기구 등의 해명에 관련되는 기초적인 정보도 얻을 수

있을 것이다.

더욱이 전기적 방법에 의한 정자융합 및 정자 또는 알에 외래 유전자를 도입하는 등에 대한 유효성에 대한 검토도 앞으로의 과제이다.