

기계적으로 다른 환경에서 예쁜 꼬마선충의 기는 파형 변화[§]

김대연* · 변수영* · 김세호* · 신현정*[†]

* 한국과학기술원 기계공학과

Effects of Mechanically Different Environments on the Crawling Waveform of *Caenorhabditis Elegans*

Daeyeon Kim*, Sooyung Byeon*, Seho Kim* and Jennifer Hyunjong Shin*[†]

* Division of Mechanical Engineering, School of Mechanical, Aerospace and Systems Engineering, KAIST

(Received May 31, 2011; Revised November 1, 2011; Accepted November 3, 2011)

Key Words : *Caenorhabditis Elegans*(예쁜 꼬마선충), Crawling Motion(기는 운동), Mechanosensation(기계적인 감각)

초록: 예쁜 꼬마선충은 모델 생물로서 지금까지 행동과 이를 제어하는 신경세포들 사이의 관계를 밝히기 위한 많은 연구들이 수행되었다. 본 연구에서는 표면의 강성이 다른 고체 환경에서 꼬마선충의 운동관련 적응 행동을 연구하였다. 꼬마선충은 고체 위에서 움직일 때 기는 파형을 조절함으로써 기계적으로 다른 환경에 적응을 한다. 즉, 외부환경이 더 단단해질수록 꼬마선충의 기는 파형의 진폭과 파장이 감소하게 된다. 흥미로운 사실은 기계적인 감각에 결함이 있는 돌연변이의 경우 정상 꼬마선충과는 다른 적응행동을 보인다는 것이다. 이것은 기계적으로 다른 환경에 효과적으로 적응하기 위해서 기계적인 자극을 감지하고 반응하고 적응하는 기작이 있음을 의미한다. 이에 본 연구에서는 꼬마선충이 기계적으로 다른 환경에 적응하는 과정을 설명할 수 있는 신경회로 모델을 제안하였다.

Abstract: The nematode *Caenorhabditis elegans* is a widely used model organism in biological research. Thanks to the availability of well-established knowledge about its neural connectivity, a wide range of studies have been attempted to uncover the relationship between behaviors and the responsible neurons. In our research, the adaptive behavior of *C. elegans* in solid environments with different surface rigidities is investigated, where the worm adapts to different mechanical stiffnesses by modulating its crawling waveform. The amplitude and wavelength of the crawling waveform decrease as the environment becomes more rigid. Interestingly, the mechanosensation-defective mutant shows different responses to the surface rigidity compared to those of the wild-type worm. To explain the adaptation process in mechanically different environments, we suggest a plausible neural circuit model.

1. 서론

예쁜 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)은 둥글고 긴 선충(Round worm)으로서 물기가 있는 흙 속에서 서식한다. 꼬마선충은 실험실에서 쉽게 유지 및 배양할 수 있으며 크기가 작고(~1mm) 생애주기가 짧은(~3 일) 장점을 가지고 있다.^(1,2) 뿐만 아니라 DNA 염기서열이 완전히 밝혀졌고 투명하여 관찰에 용이하고 신경세포 사이의 연결관계가 전

부 알려져 있어서 생물학 분야에서 모델 생물(Model organism)로서 활발히 연구되고 있다.⁽³⁾ 무엇보다도 꼬마선충은 전체 세포 수 959 개 중에 302 개가 신경세포로 되어있어 다양한 신경작용과 여러 가지 행동 양식을 가지고 있으므로 동물의 행동과 신경세포 사이의 관계를 연구하는 행동신경과학(Behavioral neuroscience)에 중요한 모델이 되어 왔다.

꼬마선충의 운동은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 고체 표면 위에서는 몸을 따라 일렬로 배열된 좌우 근육을 주기적으로 수축/이완 하여 뱀과 유사하게 일정한 정현파(Sinusoidal wave)를 그리며 기는 운동(Crawling motion)을 하고 유체 안에서는

[§] 이 논문은 2011년도 대한기계학회 바이오공학부문 춘계 학술대회(2011. 4. 28.-30., 포항공대) 발표논문임

[†] Corresponding Author, j_shin@kaist.ac.kr

© 2012 The Korean Society of Mechanical Engineers

수영 운동(Swimming motion)을 한다. 꼬마선충은 이 두 기본운동형태를 가지고 외부의 화학물질이나 온도변화 그리고 전기장에 대해 주성 행동(Taxis behavior)을 보이며 이를 제어하는 신경회로에 대한 활발한 연구가 수행되어 왔다.⁽⁴⁻⁶⁾ 하지만, 기계적/물리적인 환경의 차이에 따른 수영 운동과 기는 운동의 변화와 이에 관여하는 신경회로에 대한 연구는 미비한 실정이다. 최근 몇몇 연구자들에 의해 수영 운동의 경우 유체의 점성을 증가시켰을 때 꼬마선충이 진폭과 파장을 감소시킴으로써 외부의 기계적인 환경에 적응한다는 연구결과가 보고된 바 있으나,^(7,8) 기는 운동의 경우 기계적인 환경이 운동형태에 미치는 영향 및 신경회로에 대한 연구는 전무하다.

따라서 본 연구에서는 기는 운동의 경우 꼬마선충이 움직이는 표면의 강성에 따라 정현파의 형태를 어떻게 바꾸면서 적응하는지를 연구하였다. 더 나아가 외부의 기계적인 환경의 차이에 적응하는 행동에 기계적인 감각(Mechanosensation)이 관여하는지를 돌연변이 연구를 통해 고찰하고 그 결과를 토대로 기계적인 감각을 통한 정현파의 형태를 조절하는 신경회로를 최초로 제안하였다. 그러므로 본 연구는 기계적인 환경의 차이에 적응하는 동물의 적응행동과 신경세포 사이의 관계를 연구하는데 유용한 기초지식을 제공해줄 수 있는 중요한 연구결과라고 할 수 있다.

2. 실험

2.1 실험 개요

외부의 기계적인 환경의 차이를 주기 위하여 꼬마선충이 그 위에서 움직이는 아가 플레이트(Agar plate)의 아가 농도(Agar percentage)를 1~4% 조건으로 제작하였다. 최근 연구결과에 의하면 Table 1 과 같이 아가 농도가 증가할수록 아가 플레이트의 강성을 나타내는 탄성 계수(Young's modulus)가 증가한다고 보고된 바 있다.⁽⁹⁾ 따라서 아가 농도가 증가할수록 표면의 강성은 증가하게 되고 꼬마선충에 걸리는 기계적인 힘(load)이 증가하게 되어 기계적으로 다른 환경을 만들어 줄 수 있다.

실험은 두 가지 그룹에서 수행하였다(Fig. 1(a)). 첫 번째 그룹(Group 1)은 아가 플레이트 위에 꼬마선충을 올려놓고 기는 운동을 관찰하여 진폭과 파장을 분석하였다. 아가 플레이트는 물을 머금고 있는 하이드로젤(hydrogel)로서 꼬마선충이 그 위에서 기는 운동을 할 때 표면에 형성된 물과 꼬마선충 사이의 표면장력에 의해 꼬마선충이 바닥

Table 1 Young's modulus (E) of agar plates⁽⁶⁾

Agar percentage (%)	E (means \pm s.d., kPa)
2	132 \pm 20
5	213 \pm 32
8	301 \pm 32

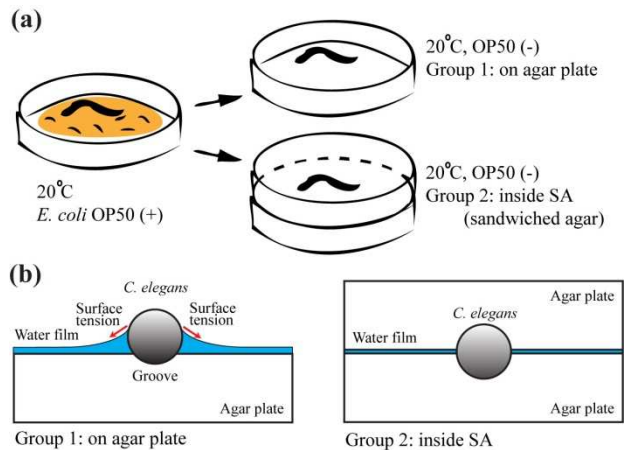


Fig. 1 (a) Experimental methods and (b) schematics of cross-sections for Group 1 and Group 2

면에 수직인 방향으로 힘을 받게 되어 아가 표면이 파이면서 홈(Groove)을 형성하게 된다(Fig. 1(b)).⁽¹⁰⁾ 하지만 첫 번째 그룹의 경우 아가는 하이드로젤의 특성 상 아가 농도에 따라 그 표면에 물층의 두께가 달라지게 되어 표면장력의 효과를 제어하기 힘들다는 단점이 있다. 따라서 이런 단점을 보완하기 위해 두 번째 그룹(Group 2)으로 아가 플레이트 위에 꼬마선충을 올려놓고 농도가 동일한 또 하나의 아가 플레이트를 덮어서 샌드위치된 상황에서 꼬마선충의 기는 운동을 관찰하고 분석하였다. 이렇게 함으로써 꼬마선충이 움직이는 동안에 표면장력의 영향을 배제하고 표면의 강성이 다른 기계적인 환경을 만들어 주었다.

2.2 꼬마선충 배양

실험을 위하여 선충 배양배지(Nematode Growth Medium Plate) 위에서 야생형(Wild-type, strain N2)과 *mec-4(d)* 돌연변이(Mutant, strain TU253) 꼬마선충을 20°C 에서 OP50 대장균(*Escherichia coli*)을 먹이로 주어 배양하였다.⁽¹¹⁾

2.3 실험절차 및 장비

첫 번째 그룹의 경우 Fig. 1 과 같이 먼저 대장

균 먹이를 충분히 주어 배양한 성충(Adults)을 백금 와이어를 이용해 먹이가 없는 아가 플레이트 위에 옮긴 후 기는 운동을 관찰하였다. 두 번째 그룹의 경우는 성충을 먹이가 없는 아가 플레이트 위에 옮긴 후 그 위에 다시 동일한 아가 농도의 플레이트를 덮어서 두 플레이트 사이에서 기는 운동을 관찰하였다. 꼬마선충의 움직임을 관찰하기 위하여 실체현미경(SMZ 800, Nikon, Japan)을 사용하였고 현미경에 디지털 비디오 카메라(HCR-HC9, Sony, Japan)를 연결하여 움직임을 녹화하였다.

2.4 실험 결과 분석

녹화한 비디오를 가지고 꼬마선충이 만드는 정현파의 진폭(A)과 파장(λ) 그리고 꼬마선충의 길이(L)를 측정하였다. 그런 다음 꼬마선충의 길이 차이에 의한 효과를 제거하기 위해서 몸 길이로 정규화한 진폭(A/L)과 파장(λ/L)을 계산하여 아가 농도에 따라 정현파의 형태가 어떻게 변화되는지를 비교/분석하였다.

3. 결과 및 토의

3.1 실험 결과

Group 1 실험군, 즉 아가 플레이트 위에서 꼬마선충이 기는 운동을 할 때 Fig. 2(a)와 같이 아가 농도가 높을수록 정현파의 파장이 감소하여 더 구불구불 한 형상을 보였다. 정현파의 형상을 Fig. 2(b)와 (c)에서 꼬마선충의 몸길이(L)로 정규화한 진폭과 파장을 정량화하여 자세히 분석하였다. 그 결과 아가 농도가 증가함에 따라 정규화된 진폭은 비교적 변함이 없었지만 파장의 경우는 감소하는 경향을 보였다.

하지만 Group 1 실험군의 경우 실험 개요에서 논의한 것 같이 아가 농도에 따른 표면장력 크기에 차이가 있을 수 있어서 최종적으로 두 번째 그룹으로 아가 플레이트 사이에 샌드위치 된 상황에서 기는 꼬마선충의 운동을 분석하였다. 그 결과 아가 농도가 증가함에 따라 정상 꼬마선충의 경우 1-4%에 걸쳐 정규화된 진폭과 파장에 대부분 유효한 감소 폭을 보여 외부의 기계적인 환경의 차이에 적응하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

한편, 꼬마선충은 몸 전체에 걸쳐 6 개의 대표적인 기계자극 수용 신경세포(Mechanoreceptor neurons: 2ALMs, AVM, 2PLMs, PVM)를 가지고 있는데⁽¹²⁾ 꼬마선충은 이 신경세포들을 통해서 외부의 기계적인 자극을 감지할 수 있다. 예를 들어 속눈썹으로 꼬마선충의 앞부분을 자극하였을 때 뒤로 후진하는 운동 반응을 보인다.

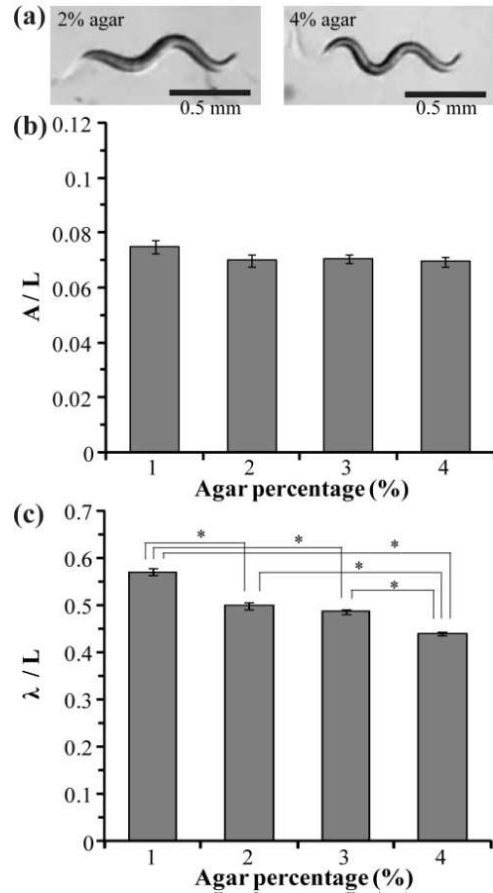


Fig. 2 (a) Snapshots of worm's waveforms on 2% and 4% agar plates. (b) The amplitude and (c) wavelength normalized by the body length(L) of the crawling waveform as a function of agar percentage (means±s.e.m., n≥27 for each, *p<0.001)

기존연구 결과에 의하면 기계자극 수용 신경세포에 결함이 있는 돌연변이 꼬마선충의 경우 속눈썹 자극에 대해 현저히 작은 반응률을 보인다고 한다.⁽¹³⁾ 따라서 이러한 기계자극 수용 신경세포에 결함이 있는 돌연변이의 경우 외부의 기계적인 물성치 변화에 반응을 보이지 못할 가능성에 대해 고찰해 보았다. 기계자극 수용 신경세포에는 기계적인 자극을 전기화학적 신호로 변환해주는 이온채널이 있는데 *mec-4* 유전자가 발현된 단백질은 이 이온채널을 이루는 서브유닛(Subunit)에 해당한다.⁽¹⁴⁾ 본 연구에서는 외부의 기계적인 환경의 차이가 있을 때 꼬마선충이 정현파의 형상을 조절하여 적응하는 행동에 있어서 기계적인 감각이 중요한 역할을 할 것으로 가정하였다. 이를 검증하기 위하여 앞에서 언급한 *mec-4(d)* 돌연변이 꼬마선충을 실험에 도입하였다. 이 돌연변이는 정상선충과 비교하여 기계적인 자극을 감지하는데 결함이 있게 된다.^(13,4)

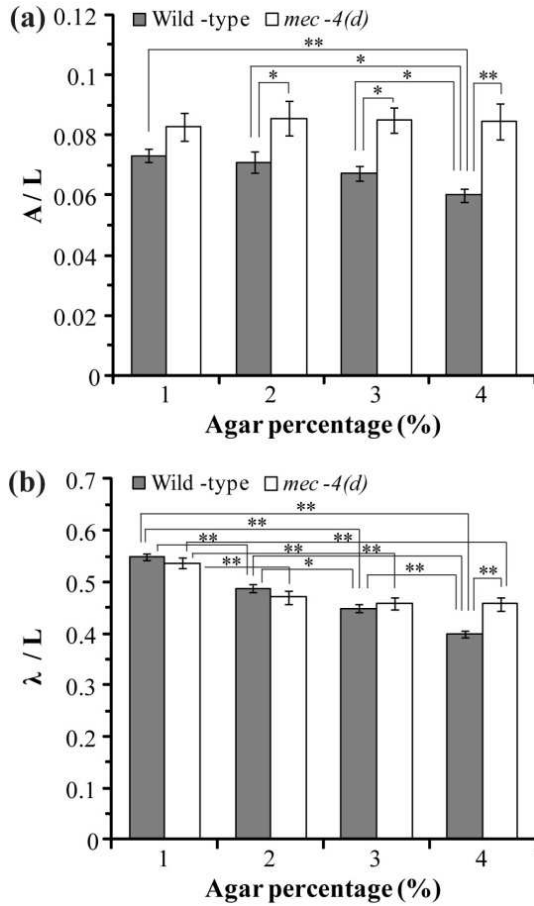


Fig. 3 (a) The amplitude and (b) wavelength normalized by the body length(L) of the crawling waveform as a function of agar percentage for wild-type and *mec-4(d)* mutant worms(means±s.e.m., n≥10 for each, *p<0.05, **p<0.001).

이 실험에서는 Group 2 실험군 조건으로 아가 농도가 증가할 때 *mec-4(d)* 돌연변이가 만드는 정현파의 형상을 분석하였다. 그 결과 Fig. 3 과 같이 돌연변이는 정상선충과 달리 아가 농도가 증가함에 따라 정규화된 진폭에 변화가 거의 없었고 파장의 경우는 어느 정도 감소하다가 3% 아가 농도에서부터 파장이 더 이상 감소하지 않고 일정하게 유지되었다. 이렇게 정현파의 형상변화에 있어서 *mec-4(d)* 돌연변이가 정상선충과 다른 경향을 보이는 결과를 바탕으로 표면강성의 차이에 적응하는 행동에 있어서 기계적인 감각이 관여한다는 것을 알 수 있다.

3.2 토의

꼬마선충이 움직이는 표면의 강성을 변화시켜가면서 꼬마선충이 만들어내는 정현파의 형상이 어떻게 바뀌는지 연구하였다. Group 1 실험군의 경우

는 아가 플레이트 위에서 기는 운동 조건을 Group 2 실험군으로는 두 아가 플레이트 사이에서 샌드위치 된 채로 기는 운동 조건을 비교 분석하였다. 정상선충의 경우 Group 1의 경우 Group 2와 달리 정현파의 A/L 에 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 그리고 λ/L 의 경우도 첫 번째 그룹의 것이 두 번째 그룹의 것보다 아가 농도에 대해 더 작은 변화 폭을 가지고 감소하는 경향을 보이는 것을 Fig. 2 와 Fig. 3 에서 알 수 있다. 이런 차이를 보이는 데에는 실험 개요에서도 논의한 것 같이 첫 번째 그룹의 경우 아가 표면의 물과 꼬마선충 사이의 표면장력을 일정하게 해줄 수 없다는 제한점이나 하나의 원인이 될 수 있을 것이다. 높은 아가 농도일수록 아가 표면에 형성된 물 층의 두께가 더 작기 때문에 일반적으로 꼬마선충에 가해지는 표면장력으로 인한 힘이 더 약해질 수 있을 것이다. 따라서 표면장력에 의한 꼬마선충을 아가 표면으로 누르는 정도는 아가 농도가 증가할수록 감소할 것이다. 이로 인해 꼬마선충이 동일한 표면장력 조건에서 표면으로부터 받는 기계적인 부하보다 실제로는 더 작은 부하를 받게 될 것으로 유추해 볼 수 있다. 또한 첫 번째 그룹 (Group 1)은 바닥면과의 접촉에 의한 기계적인 부하를 받기 때문에 선충표면 대부분이 아가와 접촉을 하고 있는 두 번째 그룹 (Group 2)에 비해 기본적으로 아가 농도가 증가함에 따라 기계적인 부하의 증가 정도가 작게 된다. 이러한 이유로 인해 두 번째 그룹과 비교하여 첫 번째 그룹에서 A/L 의 감소경향이 두드러지게 보이지 않을 수 있으며 λ/L 의 경우는 더 작은 기울기를 보이는 것으로 판단 된다. 따라서 본 연구에서 다루고자 했던 표면의 강성에 따른 꼬마선충의 정현파 변화를 알아보는 데 Group 2 실험군의 결과가 적절하며 정상 꼬마선충은 표면의 강성이 증가함에 따라 기는 파형의 진폭과 파장을 감소시키면서 외부의 기계적인 환경의 차이에 적응한다는 것을 알 수 있다.

한편, Fig. 3 에서 돌연변이의 경우 정상선충과 비교했을 때 아가 농도가 증가함에 따라 A/L 은 변화되지 않고 λ/L 은 높은 아가 농도에서 일정하게 유지되었다. 꼬마선충은 기는 운동을 할 때 몸을 따라 일렬로 분포된 근육을 수축/이완함으로써 정현파를 만들어낸다. 이 때 머리와 목 부분의 근육부터 시작하여 꼬리까지 순차적으로 수축/이완됨으로써 정현파의 형상이 결정되게 된다. 따라서 머리와 목 부분의 근육을 자극하는 모터 뉴런 (Motor neuron)이 정현파의 형상을 결정하는데 중

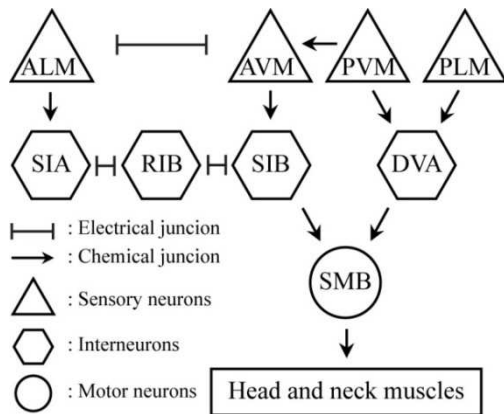


Fig. 4 A neural circuit model for the adaptive crawling locomotion

요한 역할을 할 것이다. 최근 연구 결과가 이를 뒷받침하고 있는데⁽¹⁵⁾ 이 연구에서는 머리와 목 부분의 근육을 자극하는 모터 뉴런인 SMB 뉴런을 레이저 어블레이션(Laser ablation)으로 제거한 꼬마선충의 기는 운동을 관찰 한 결과 정상 꼬마선충에 비해 정현파의 진폭과 파장이 크게 증가하는 것을 보고하였다. 이 연구결과와 본 연구의 결과 그리고 기존에 이미 알려진 전체 신경세포들 사이의 연결관계⁽³⁾ 바탕으로 기계적인 감각에 의해 어떻게 정현파의 형상이 조절될 수 있을지에 대한 신경회로 모델을 Fig. 4 와 같이 제안하였다.

꼬마선충은 표면강성이 다른 외부환경의 차이를 앞에서 논의한 기계자극 수용 신경세포를 통해 감지하게 된다. 감지한 자극에 대한 신호는 여러 인터뉴런(Interneuron)들을 거쳐 통합되어 SMB 모터 뉴런에 시냅스(Synapse)를 매개로 한 화학적인 결합(Chemical junction)을 통해 전달된다. SMB 모터 뉴런은 전달된 신호로 머리와 목 부분의 근육을 자극하여 정현파의 형상을 조절하게 된다. 이 때 기존연구에서와 같이 신경회로에서 최말단에 있는 SMB 모터 뉴런을 제거한 경우 SMB 모터 뉴런의 기능이 완전히 사라져서 정현파의 진폭과 파장이 크게 증가하는 심한 표현형(Phenotype)을 보이게 된다. 반면, *mec-4(d)* 돌연변이의 경우 기계자극 수용 신경세포의 결함으로 인해 표면강성을 감지하는 신호가 약해져서 SMB 모터 뉴런에 전달되는 감각 신호가 정상 꼬마선충에 비해 약해질 것이다. *mec-4(d)* 돌연변이의 경우 SMB 모터 뉴런이 여전히 기능을 하기 때문에 이를 제거한 꼬마선충 보다는 정현파의 형상을 조절하는데 있어서 높은 아가 농도에서 λ/L 이 일정하게 유지되는 것 같이 그 결함 정도가 더 작게 나타날 것이다.

4. 결 론

꼬마선충이 고체표면에서 기는 운동을 할 때 바닥 면의 강성에 따라 정현파의 형태를 어떻게 바꾸면서 적응하는지를 연구하였다. 꼬마선충은 표면의 강성이 증가하여 기계적인 부하를 많이 받을 수록 정현파의 진폭과 파장을 감소시키면서 형태를 바꾸었다. 기계자극 수용 신경세포에 결함이 있는 돌연변이 연구를 통해 이런 적응행동에 기계적인 감각이 필요하다는 것을 알 수 있었고 이를 설명하는 신경회로 모델을 최초로 제안하였다. 이 연구결과는 동물의 행동을 연구하는 동물 생태학 분야나 동물의 행동과 이를 제어하는 신경세포들 사이의 관계를 규명하는 행동 신경과학 분야에 유용한 기초지식을 제공해 줄 것이다.

후 기

이 논문은 한국연구재단(National Research Foundation)으로부터 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 2010-0016886).

참고문헌

- (1) Byerly, L., Cassada, R. C. and Russell, R. L., 1976, "The Life Cycle of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*," *Dev Biol*, Vol. 51, No. 1, pp. 23~33.
- (2) Wood, W. B., 1988, "The Nematode *Caenorhabditis Elegans*," Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1~16.
- (3) White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. and Brenner, S. 1986, "The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*," *Philos Trans R Soc Lond B*, Vol. 314, No. 1165, pp. 1~340.
- (4) Iino, Y. and Yoshida, K. 2009, "Parallel Use of Two Behavioral Mechanisms for Chemotaxis in *Caenorhabditis Elegans*," *J Neurosci*, Vol. 29, No. 17, pp. 5370~5380.
- (5) Mori, I. and Ohshima, Y. 1995, "Neural Regulation of Thermotaxis in *Caenorhabditis Elegans*," *Nature*, Vol. 376, pp. 344~348.
- (6) Gabel, C. V., Gabel, H., Pavlichin, D., Kao, A., Clark, D. A. and Samuel, A. D. T. 2007, "Neural Circuits Mediate Electrosensory Behavior in *Caenorhabditis Elegans*," *J Neurosci*, Vol. 27, No. 28, pp. 7586~7596.
- (7) Berri, S., Boyle, J. H., Tassieri, M., Hope, I. A. and Cohen, N., 2009 "Forward Locomotion of the Nematode *C. Elegans* is Achieved Through Modulation of a Single Gait" *HFSP J*, Vol. 3, No. 3,

- pp. 186~193.
- (8) Fang-Yen, C., Wyart, M., Xie, J., Kawai, R., Kodger, T., Chen, S., Wen, Q. and Samuel, A. D. T., 2010, "Biomechanical Analysis of Gait Adaptation in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*," *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 107, No. 47, pp. 20323~20328.
- (9) Park, S. J., Goodman, M. B. and Pruitt, B. L., 2007, "Analysis of Nematode Mechanics by Piezoresistive Displacement Clamp," *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 104, No. 44, pp. 17376~17381.
- (10) Niebur, E. and Erdős, P., 1991, "Theory of the Locomotion of Nematodes: Dynamics of Undulatory Progression on a Surface," *Biophys J*, Vol. 60, No. 5, pp. 1132~1146.
- (11) Brenner, S., 1974, "The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*," *Genetics*, Vol. 77, No. 1, pp. 71~94.
- (12) Goodman, M. B. and Schwarz, E. M., 2003, "Transducing Touch in *Caenorhabditis Elegans*," *Annu Rev Physiol*, Vol. 65, pp. 429~452.
- (13) Chatzigeorgiou, M., Grundy, L., Kindt, K. S., Lee, W.-H., Driscoll, M. and Schafer, W. R., 2010, "Spatial Asymmetry in the Mechanosensory Phenotypes of the *C. elegans* DEG/ENaC Gene *mec-10*," *J Neurophysiol*, Vol. 104, No. 6, pp. 3334~3344.
- (14) O'Hagan, R., Chalfie, M. and Goodman, M. B., 2005, "The MEC-4 DEG/ENaC Channel of *Caenorhabditis Elegans* Touch Receptor Neurons Transduces Mechanical Signals," *Nat Neurosci*, Vol. 8, No. 1, pp. 43~50.
- (15) Gray, J. M., Hill, J. J. and Bargmann, C. I., 2005, "A Circuit for Navigation in *Caenorhabditis Elegans*," *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 102, No. 9, pp. 3184~3191.