

Mesodermal Patterning in Ascidian Embryos

김길중

강릉대학교 생명과학대학 해양생명공학부

Abstract

In ascidians, a primitive chordate, maternal cytoplasmic factors and inductive interactions are involved in the specification of cell fate in early embryos. The larval structure of ascidians is relatively simple, and the major mesodermal tissues of the tadpole larva are notochord, muscle and mesenchyme. Formation of muscle cells is a cell-autonomous process, and localized maternal *macho-1* mRNA specify muscle fate in the posterior marginal zone of the early embryo. In contrast, inductive influence from endoderm precursors plays important roles in the specification of notochord and mesenchyme fates. FGF-Ras-MAPK signaling is involved in the induction of both tissues. The difference in responsiveness of the posterior mesenchyme and anterior notochord precursors is caused by the presence or absence of the posterior-vegetal egg cytoplasm, respectively. In these cases, directed signal may polarizes the responding cells and cause asymmetric cell divisions that operate in both the anterior and posterior regions.

Introduction

멍게는 척삭동물문 (phylum Chordata)에 속하는 하등 무척추동물로 올챙이 모양을 하고 있는 유생 (tadpole larva)은 척삭동물의 원시조상과 유사한 형태를 하고 있다고 추측된다. 유생기에 일시적으로 동체 후부에서 미부 말단에 이르는 위치에 척삭 (notochord; 척색)을 가지며, 그 상부에 척추동물의 신경관을 닮은 신경삭 (nerve cord)을 형성한다. 멍게는 오래전부터 발생생물학의 실험재료로 사용되어 왔으며, 모자이크 발생을 하는 대표적 동물로 알려져 왔다. 특히, 근육세포의 형성을 결정하는 모성세포질 결정인자 (maternal cytoplasmic

determinants; myoplasm)는 유명하다. 명개 배 (embryo) 발생과정의 특징으로 원장합입 시기의 배를 구성하는 소수의 세포 (110개 전후), 개체간에 차이를 보이지 않는 난할 (cleavage) 양식, 그리고 유생기까지의 발생이 비교적 빠른 것을 들 수 있다. 초기 배발생기까지 세포계보 (cell lineage)가 완벽하게 조사되었고, 각 구성세포들의 분화 markers도 다양하게 준비되어 있다. 명개 배는 110세포기 정도의 초기 발생단계까지는 비교적 용이하게 할구(blastomeres)를 분리 (isolation)할 수 있으며, 분리한 할구들을 재결합 (recombination)하여 세포 분화를 단일 세포수준에서 해석할 수 있다. 최근, 여러 연구자들에 의하여 genome projects (http://spider.jgi-psf.org/programs/ciona/ciona_mainpage.html, <http://www.genome.ad.jp/magest/>, <http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>)가 수행되어 발생생물학 연구의 모델동물로 앞으로 비약적인 발전이 기대된다.

명개 110세포기 배를 구성하는 대부분의 할구는 하나의 조직을 형성하도록 발생운명 (developmental fates)이 결정되어 있다. 이때의 각 할구를 분리하여 부분배 (partial embryos)로서 배양하면, 예정된 운명을 따라 조직분화가 일어난다. 본 발표에서는 명개 배발생 과정에서 모성세포질 결정인자와 유도적 상호작용 (inductive interactions)에 의하여 중배엽 (mesoderm)의 형성과 patterning이 수행된다는 것을 보고한다. 명개 유생의 주요한 중배엽조직으로는 척삭, 근육 (muscle) 그리고 간충직 (mesenchyme) 세포를 들 수 있다. 원장합입 직전 배의 식물반구 (vegetal hemisphere) 가장자리에 중배엽 전구세포들 (precursors)이 위치하고, 중앙에 내배엽 (endoderm) 전구세포가 자리한다.

Maternal *macho-1* mRNA determines muscle fate

명개 유생의 피부에는 척삭 좌우 양측에 근육세포가 존재하여 부화 이후 고착 전까지 유영생활을 한다. 이들 근육세포의 대부분 (1차 근육세포)은 8세포기의 식물반구 후방할구 (B4.1)에서 유래한다. 나머지 근육세포 (2차 근육세포)들은 유래가 다르며, 세포분화에 있어서도 유도작용을 필요로 한다. 앞서 언급하였듯이 근육세포의 발생운명은 난자의 특정 세포질 영역에 존재하는 인자에 의하여 결정된다는 것이 이미 100여년 전에 시사되었다. 수정이후 연속적인 배세포 해리 (dissociation) 실험 및 각 세포기에서 근육 전구세포의 분리 실험에 의하여 1차 근육세포의 분화는 세포 자율적 과정(a cell-autonomous process)으로 결정된다는 것이 밝혀졌다. 또한, 난자 및 8세포기 배의 세포질을 부분적으로 절제하여 표피 (epidermis) 세포로 분화할 운명의 할구 (근육세포의

운명은 가지지 않음)에 이식 (transplantation)하는 실험을 통하여 근육세포 결정 인자의 분포가 조사되었다. 근육세포의 결정인자는 난자의 식물극 후방세포질 (posterior-vegetal cytoplasm; PVC) 영역에 위치하며, 8세포기의 B4.1 할구로 전달되는 것이 밝혀졌다. PVC가 제거된 난자에서 발생한 배는 근육의 형성이 억제되었다

최근 근육세포 결정인자의 유력한 후보로서 *macho-1* mRNA가 cloning되었다. whole-mount *in situ* hybridization에 의한 *macho-1* mRNA의 분포는 세포질 이식 실험에 의하여 조사된 것과 일치하였다. 즉, *macho-1* mRNA는 난자의 PVC에 존재하였으며, 8세포기에는 B4.1 할구에 국재했다. *macho-1* mRNA를 과잉발현시킨 배에서는 근육세포 분화가 과다하게 관찰되었다. *macho-1* mRNA에 대한 antisense oligonucleotide (phosphorothioate oligo)를 미수정란에 주입하여 maternal *macho-1* mRNA를 제거한 후, 수정하여 발생시킨 유생은 미부 형성에서 이상을 보였으며 근육세포가 거의 형성되지 않았다. 일부 형성된 근육세포는 유도적 상호작용에 의하여 만들어진 2차 근육세포임이 확인되었다. 또한, *macho-1* mRNA가 제거된 난자에 *in vitro* 합성된 *macho-1* mRNA를 주입한 후, B4.1 할구를 분리하여 1차 근육세포의 형성을 조사한 결과 근육세포 분화가 일어났다. 더욱이, maternal *macho-1* mRNA가 제거된 난자에서 근육세포 결정 인자가 분포하는 세포질 영역을 절제하여 표피 전구할구에 이식하였을 때 근육세포의 형성이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는, *macho-1* mRNA가 근육세포 분화를 결정하는 모성 세포질 인자임을 증명한다.

Inductive interaction is required for notochord and mesenchyme formation

앞서 근육세포의 형성에서 살펴본 것처럼 멍게 배는 모자이크 발생 양식을 보이는 한편, 척삭과 간충직세포의 형성에 있어서는 유도에 의한 조절적 발생을 나타낸다. 간충직 전구할구를 8세포기에서 110세포기까지 각 단계에서 분리하여 부분배로 배양한 결과, 32세포기에서 유래한 부분배를 제외하고 간충직세포의 분화가 관찰되었다. 32세포기의 간충직 전구할구를 인접하고 있는 여러 할구들과 각각 재결합하여 배양한 결과, 내배엽 전구할구와 재결합되었을 때 간충직의 분화가 일어났고, 그 이외의 경우에는 나타나지 않았다. 이는 32세포기의 내배엽 전구할구에서 간충직세포의 분화를 유도하는 신호를 방출하고 있을 가능성을 시사한다. 이와 같은 실험결과는 척삭의 경우에 있어서도 매우 유사함을 보였다. 즉, 32세포배에서 분리한 척삭 전구할구는 척삭세포

의 분화를 보이지 않았지만, 이를 내배엽과 재결합시키면 척삭세포의 분화가 일어났다.

내배엽세포로부터 방출되어 척삭과 간충직 세포분화를 유도하는 유력한 후보로 섬유아세포 증식인자 (fibroblast growth factor; FGF)가 지적되었다. 단독으로는 척삭과 간충직 세포로 분화하지 않는 32세포기에서 분리한 각 전구세포를 FGF protein과 함께 배양한 결과, 부분배를 구성하는 모든 세포가 각각 척삭과 간충직세포로 발생하였다. 32세포기의 척삭할구는 척삭이외에 신경삭의 운명을, 간충직할구는 근육의 운명을 함께 가지고 있다. 과잉의 FGF signal에 의하여 신경삭과 근육의 운명이 각기 척삭과 간충직으로 변경된 것이다. 척삭과 간충직 세포분화를 유도하는 인자가 FGF signal(s)이라는 것은 FGF receptor 기능저해 실험 (by a dominant-negative form of the FGF receptor, and by an FGF receptor inhibitor SU5402) 및 FGF signaling transduction pathway에서 중심적 역할을 하는 Ras (by a dominant-negative form of Ras)와 MEK(MAP kinase kinase)-MAP kinase (by an MEK inhibitor U0126)의 활성화 억제를 통하여 확인되었다. 각 저해 및 억제 실험 결과, 척삭과 간충직세포의 분화는 일어나지 않았고, 척삭과 간충직 전구할구는 각각 신경삭과 근육세포로 발생되었다.

The posterior-vegetal cytoplasm causes the difference in the responsiveness of notochord and mesenchyme precursors

초기 낭배 (gastrula)의 식물반구 앞쪽 가장자리에 신경삭 전구세포가 자리하고, 뒤쪽 가장자리에 근육 전구세포가 위치한다. 식물극 중앙에 위치하는 내배엽 전구세포와 신경삭 사이에 척삭 전구세포가, 내배엽과 근육 사이에 간충직 전구세포가 자리한다. 앞에서 살펴본 바와 같이 척삭과 간충직 세포분화 과정은 매우 유사하다. 척삭 전구할구는 내배엽에 의한 유도가 일어나는 시기인 32세포기에 신경삭의 운명을 함께 가진다. 척삭의 유도가 일어나지 않으면 척삭 전구할구는 신경삭으로 분화하며, 32세포기에서 분리한 척삭 (척삭-신경삭) 전구할구를 FGF로 처리하면 부분배를 구성하는 모든 세포가 척삭으로 분화된다. 32세포기의 간충직 전구할구에는 간충직의 운명과 함께 근육의 운명도 포함된다. 간충직 유도가 억제되면 간충직 (간충직-근육) 전구할구는 근육으로 발생된다. 32세포기의 간충직 전구할구를 FGF로 처리하면 근육의 분화는 억제되고, 간충직의 분화만이 관찰된다.

이러한 결과는, 척삭과 간충직의 분화에서 두 전구세포가 유도신호에 반응

하는 어떠한 차이를 가진다는 가능성을 시사한다. 이를 확인하기 위하여 먼저, PVC를 제거한 후 척삭과 간충직 분화에 어떠한 변화가 일어나는지 조사하였다. PVC를 제거한 경우 간충직세포의 분화는 일어나지 않았지만, 척삭세포는 원래의 위치와 간충직이 형성될 위치에 동심원상으로 과잉형성되었다. 이와 반대로 난자의 식물극 전방세포질 (anterior-vegetal cytoplasm; AVC)을 제거해도 척삭과 간충직세포의 분화는 정상이었다. 절제한 PVC를 정상 난자의 식물극 전방영역에 이식한 결과, 간충직세포가 후방영역은 물론 전방영역에도 이소적 (ectopic)으로 형성되었으나 (이소적 근육형성 역시 일어남), 척삭세포의 분화는 억제되었다. 그러나, AVC를 정상 난자의 식물극 후방영역에 이식해도 척삭과 간충직의 형성은 영향을 받지 않았다. 또한, 내배엽 전구할구를 분리하여 척삭과 간충직 전구할구와 각각 다양하게 재결합한 결과, 척삭과 간충직의 분화를 유도하는 내배엽의 능력에는 차이가 없음이 밝혀졌다. 즉, 32세포기의 각 내배엽할구들은 척삭과 간충직 세포를 모두 유도할 수 있었다. 따라서, PVC를 가지는 할구가 내배엽으로부터 유도신호를 받으면 간충직세포로 분화하고, 같은 유도신호를 PVC를 가지지 못한 할구가 받으면 척삭으로 분화한다는 것이 명확하게 되었다.

Asymmetric cell division is directed by inductive signal

척삭과 간충직 세포분화의 유도는 32세포기에 일어난다. 그러나, 앞서 지적했듯이 32세포기의 척삭 전구할구는 신경삭의 운명을 함께 가지며, 간충직은 근육의 운명을 함께 가진다. 이들은 다음 세포분열, 즉 64세포기 (정확하게는 44세포기)에 각각의 운명으로 나뉜다. 이때 언제나 내배엽과 접하는 위치에 척삭 (전방)과 간충직 (후방)이 형성되고, 반대쪽에 신경삭 (전방)과 근육 (후방)이 만들어진다. 이것은 명개 발생의 특징으로 척추동물의 경우처럼 많은 세포가 동시에 유도되어 하나의 발생운명을 나타내는 것과 구분된다.

32세포배의 간충직-근육 전구할구에서는 운명이 나뉘기 전에 근육특이적 유전자인 actin mRNA (*HrMA4*)의 발현이 시작된다. 64세포배에서 actin mRNA의 발현은 근육 전구할구에서는 계속되지만, 간충직 전구할구에서는 곧 바로 억제 (down-regulation)된다. 32세포배에서 간충직-근육 전구할구를 분리, 유도신호를 받지 못하는 상황에서 1회 세포분열후, actin mRNA의 발현을 조사하면 2개의 딸세포 (daughter cells)에서 모두 검출된다. 32세포배의 간충직-근육 전구할구를 FGF가 존재하는 상황에서 배양하면, 2개의 딸세포 모두에서 actin

mRNA의 발현은 검출되지 않는다. 이들이 모두 간충직세포로 분화됨은 앞에서 언급하였다. 간충직-근육 전구할구에서 default 운명이 근육이고, 유도된 운명이 간충직이다. 또한, 간충직할구가 유도없이 근육세포로 분화되는 것에서 간충직할구에도 *macho-1* protein이 존재할 것으로 여겨진다. 따라서, *macho-1* mRNA가 PVC인자일 가능성이 시사된다. 척삭-신경삭 전구할구의 경우에서도 동일한 실험결과가 관찰된다. 이 경우, default 운명은 신경삭이고, 유도된 운명은 척삭이다.

이상의 결과에서 다음과 같은 명개 증배엽 분화 model이 시사된다. 32세포기의 내배엽 전구할구에서 방출되는 FGF (directed signal)는 척삭-신경삭 전구할구와 간충직-근육 전구할구의 비대칭 분열 (asymmetric cell division)을 일으킨다. 이는 FGF signal에 의하여 변화된 (아마 활성화된) 인자가 신경삭과 근육이 형성될 세포질 영역보다 척삭과 간충직의 형성영역에 치우쳐 분포하는 것으로 야기된다고 추측된다. 본 model의 타당성은 앞으로 활성형 MAP kinase의 세포내 분포를 조사하는 방법 등으로 밝혀지리라 생각한다.