

## 계대핵치환에 의한 무미 양서류 중간핵치환개체의 발생수행능력 증진에 관한 연구

이자경 · 정해문

서울대학교 사범대학 생물교육과

포배단계의 북미산 표범개구리 *Rana pipiens*의 핵을 북방산개구리 *Rana dybowskii*의 무핵 수정란에 이식하여 형성되는 nucleocytoplasmic hybrid 개체는 낭배운동을 전후하여 모두 치사한다.

치사조합 개체의 발생수행능력의 증진을 위하여 치사직전의 핵을 취하여 북방산개구리의 무핵 수정란에 계대핵치환 시킨 결과 제 1대 핵치환의 경우와 마찬가지로 낭배기를 전후하여 치사하는 것으로 나타나 발생수행능력의 커다란 증진은 관찰되지 않았다. 그러나 15대까지 계대핵치환이 진행되는 동안 초기낭배 까지의 발생은 일정비율로 진행되므로 영속적인 DNA의 복제와 세포분열은 가능한 것으로 나타났다.

한편 중간핵치환된 개체의 상당수에서 비정상적인 형태를 가진 염색체와 수에 이상이 일어났음이 관찰되었다. 이와 같은 염색체의 이상은 정상 개체로 이식된 조직이 치사되는 점으로 미루어 영구적인 변화로 보이며 이로 인한 비정상적인 유전자의 활동이 개체를 발생의 초기 단계에서 치사시키는 것으로 사료된다.

**KEY WORDS:** Nucleocytoplasmic hybrid, Developmental capacity, Serial nuclear transplantation, Amphibian

발생도중 유전자의 비가역적 소실 여부를 조사할 수 있는 가장 적절한 방법으로 개발, 발전해온 핵치환 기술은 초기발생동안의 핵과 세포질의 상호 작용을 규명하는데 중요한 정보를 제공해 주고 있다. 분화된 양서류 세포핵의 발생수행능력을 종합해 보면 포배단계까지는 완전한 성체까지로의 발생이 가능하지만 (Briggs & King, 1952), 발생이 진전됨에 따라 발생수행능력도 차츰 저하되어 물갈퀴 세포 (Gurdon, 1962)나 erythrocyte (DiBerardino *et al.* 1986; DiBerardino, 1987)와 같은 최종단계까지 분화된 세포핵을 주입할 경우에는 변태시기까지 발생이 가능한 것으로 나타났다. 따라서 세포의 분화도중에는 전반적인 유전자의 소실이 수반되지 않는 것으로 보이며 그 결과 여러기관을 발생시킬 수 있는 pluripotent한 능력을 유지하는 것

으로 보인다.

특히 한종의 핵을 이종의 무핵 수정란에 치환 시킴으로써 얻어지는 이른바 nucleocytoplasmic hybrid는 핵과 세포질의 제공자가 명확히 구분되며 정상적인 복상의 유전자를 가지므로 이를 이용한 많은 연구가 진행되어 왔다 (Hennen, 1965, 1974; Gallien *et al.* 1973; Gurdon, 1986). Gallien 등(1973)은 *Pleurodeles*의 두 아종을 사용한 실험에서 난자로 사용한 종의 기여는 색소 및 size 등의 egg에 관한 것 뿐이며 이후의 발생양상은 핵유전자의 특징에 의해 지배된다는 사실을 isoenzyme의 pattern을 발생단계로 추적하여 명확히 밝혔다. 반면에 대부분의 아종 및 종간 핵치환은 발생초기에 치사하는 치사조합으로 포배기부터 부화기 사이의 결정적 시기 (crucial period)에 발생이 정지된다 (Hennen, 1965, 1972). 특히 속간핵치환의 경우 발생율이 현저히 저하되는데 이는 계통발생상의 거리가 먼 종일수록 발생수행능력이 저하되는 현상을

본 연구는 1988년도 과학재단과 문교부의 지원으로 수행된 것임.

보이는 것으로써 Gurdon(1969) 이나 Gallien (1973) 등도 무미양서류를 재료로 한 실험에서 같은 결과를 보고하였다. 양서류를 재료로한 치사 중간핵치환의 공통적 특징은 포배기까지는 모든 조합에서 생존이 가능하다는 점과 낭배운동의 시간이 정상개체에 비해 길어지며 지연된다는 점을 들 수 있다 (Gurdon, 1986).

한편, 국내 서식종 중 비교적 계통발생상의 거리가 가까운 무미양서류인 북방산개구리 (*Rana dybowskii*), 참 개구리 (*Rana nigromaculata*)와 외국 양서류인 북미산 표범개구리 (*Rana pipiens*), *Xenopus laevis* 및 *Ambystoma mexicanum* 간의 핵치환 결과 대부분의 경우 낭배기 단계에서 발생이 중지됨을 보였다 (Lee & Chung, 1988). 따라서 본 연구에서는 비교적 발생율이 높았던 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)와 북미산 표범개구리 (*Rana pipiens*) 사이의 nucleocytoplasmic hybrid를 형성한 후, 계대핵치환을 통한 발생을 증진 여부를 조사하는데 그 목적을 두었다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 연구에서는 국내 서식종인 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)와 국외종인 북미산 표범개구리

(*Rana pipiens*)가 사용되었다. 북방산개구리는 동면 직후에 채집하여 암수를 분리시킨 후, 4-5°C의 가동면상태를 유지시켰으며 필요시 실온에 꺼내어 사용하였다. 북미산 표범개구리는 구입 후 상온에서 사육하면서 사용하였다.

#### 인공배란 및 수정

배란과 인공수정은 통상으로 이용되는 Hamburger (1960)의 방법을 따랐다. 즉, 성숙한 암컷의 복강내에 3-4개의 뇌하수체로 만든 현탁액을 주사하여 배란을 유도하고 그 위에 정자 현탁액을 뿌려 주어 인공수정 시켰다.

#### 핵치환

핵치환은 Briggs와 King (1952)의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 254 nm 파장의 자외선을 조사하여 (640 ergs/mm<sup>2</sup>) DNA를 파괴시킨 정자로 수정시킨 후 제2극체 방출시 예리한 유리침으로 exovate을 만들어 난핵을 제거하여 활성화된 무핵의 recipient를 얻는다. 한편, 후기 포배단계에 도달한 embryo를 예리한 forceps을 사용하여 vitelline envelope을 벗기고 핵이식 1~2시간 전에 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>을 포함하지 않은 100% Steinberg액에서 protease와 EDTA를 처리하여 세포를 분리시킨다. 분리된 세포들의 핵은 micromanipulator를 사용하여 무핵의 난에 주입하였다. 이때 과다한 세포질 유출을 방지하기 위하여 상기 용액으로 만든 20% Ficoll용액에

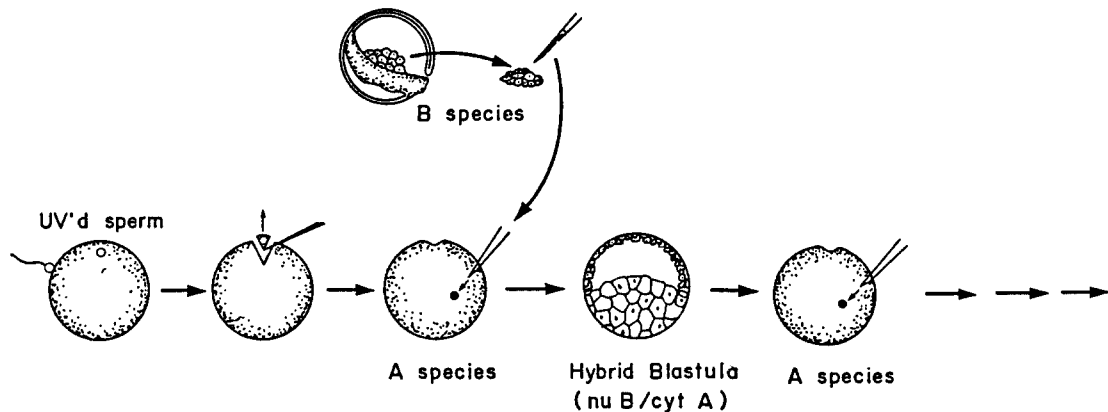


Fig. 1. Design of the Serial Nuclear Transplantation Experiments.

서 핵치환을 수행하며 상처가 치유된 후에는 10% Steinberg액으로 옮긴다. 계대핵치환은 1차 핵치환된 포배기 embryo를 donor로 사용하여 핵치환을 반복 수행하는 경우를 말하며 그 과정은 Fig. 1에 나타낸 바와 같다.

### 핵형 분석과 조직 이식

핵형 분석은 통상 이용되는 방법에 따라 포배기에 도달한 embryo를 forcep으로 찢고 세포의 일부를 취하여 Hematoxylin-eosin염색을 한 후 압착시켜 검경한다.

조직 이식은 4×100% Steinberg 용액에서 종전의 방법 (Chung & Malacinski, 1975)에 따라 수행하였다.

## 결 과

### 계대핵치환 (Serial nuclear transfer)

북미산 표범개구리 (*Rana pipiens*)의 포배기 핵을 국내종 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)의 수정란에 중간핵치환 시킨 결과는 치사 조합으로 판명된 바 있으며 (Lee & Chung, 1988), 이들의 포배기핵을 다시 *R. dybowskii*에 계속 계대핵치환시킨 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 각 대에서 핵치환된 난의 60-70% 정도가 발생을 시작하며 그 중에서 60-80%가 포배기에 도달한 것을 보여주고 있다. 그러나 15대에 이르기까지 *R. dybowskii*로 계대핵치환을 수행한 결과는 발생수행능력에 전혀 증진을 수반하지 않았다. 즉 계대핵치환된 모든 개체들은 제 1대

**Table 1.** Development of serial transfer embryo of interspecific nucleocytoplasmic hybrids. (*R. pip*<sup>2)</sup>→*R. dyb*<sup>3)</sup>→*R. dyb*→*R. dyb*)

No. of Exp.	Total transfer <sup>1)</sup>	No. of Developing embryo	No. of Developing Embryo			
			Partial blastula	Blastula	Gastrula	Larva
1st (p→d)	45	35 (100%)	8	27 (77%)	(2)*	·
2nd (p→d→d)	63	54 (100%)	11	43 (80%)	(3)*	·
3rd	32	24 (100%)	6	18 (75%)	·	·
4th	29	23 (100%)	8	15 (65%)	(2)*	·
6th	26	22 (100%)	6	16 (73%)	·	·
7th	27	21 (100%)	6	15 (71%)	·	·
8th	31	27 (100%)	6	21 (78%)	(3)*	·
9th	49	33 (100%)	13	20 (61%)	·	·
10th	60	49 (100%)	8	41 (84%)	(2)*	·
11th	58	43 (100%)	8	35 (81%)	·	·
12th	56	47 (100%)	16	31 (66%)	·	·
13th	44	37 (100%)	8	29 (78%)	(2)*	·
14th	28	22 (100%)	6	16 (73%)	·	·
15th	25	21 (100%)	7	14 (67%)	·	·
	27	23 (100%)	5	18 (78%)	·	·

1) donor nuclei were taken from late blastula (Stage 9) of *R. pipiens*

2) *R. pip*: *Rana pipiens*

3) *R. dyb*: *Rana dybowskii*

( )\*: partial gastrulation

의 중간핵치환 개체와 마찬가지로 상실기까지의 초기분열은 동종간의 핵치환과 거의 같은 정도의 발생율을 나타내나 상실기 이후 점진적인 생존율 감소를 보이다가 원구 함입이 일어난 직후에 더 이상의 낭배운동이 진행되지 못하고 모두 발생이 중지된다. 다음대의 핵치환에 donor로 사용한 일부를 제외한 나머지 개체들은 외향낭배운동 (exogastrulation)의 양상을 보이면서 24 시간 이상 발생중지상태를 유지하다가 결국 세포질 분해를 일으켜 모두 죽게된다.

### 핵형 분석 (Karyological analysis)

상기 이종간의 핵치환이 치사 조합이 되는 원인을 규명하기 위한 조사의 일환으로 핵치환된 embryo의 핵형을 분석하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 이들 개체의 상당수에서 비정상인 염색체의 형태와 수가 관찰되었다. 즉, 염색체의 수가 적거나(hypoploidy) 많은 경우 (hyperploi-

dy)가 보였으며 환상 염색체나 절편이 다수 관찰되었다. 이와 같은 비정상적인 염색체는 치사가 일찍 일어나는 embryo에서 더욱 현저하게 나타난다.

### 조직 이식 (Tissue graft)

상기 치사 종간 핵치환 embryo핵의 기관 발생에 참여하는 정도를 조사하기 위하여 치사 전 외배엽 부분을 정상 embryo의 같은 부위에 이식하였다. 치사조합 (*R. pip* 핵→*R. dyb* 세포질) 포배기의 미래의 외배엽 부분을 *R. pipiens* 또는 *R. dybowskii*의 정상 포배에 이식한 경우는 처음에는 정상개체사이의 이식과 마찬가지로 완전한 치유상태를 보이며 정상적인 피부로 보이나 발생이 진전됨에 따라 신경배 이후 tail bud시기에 도달 하면 이식 부위가 자라나지 못하고 Fig. 3에서와 같이 결국 주위의 정상 조직에 의하여 대체된다. 따라서 이종의 세포질에서 유전자의 활

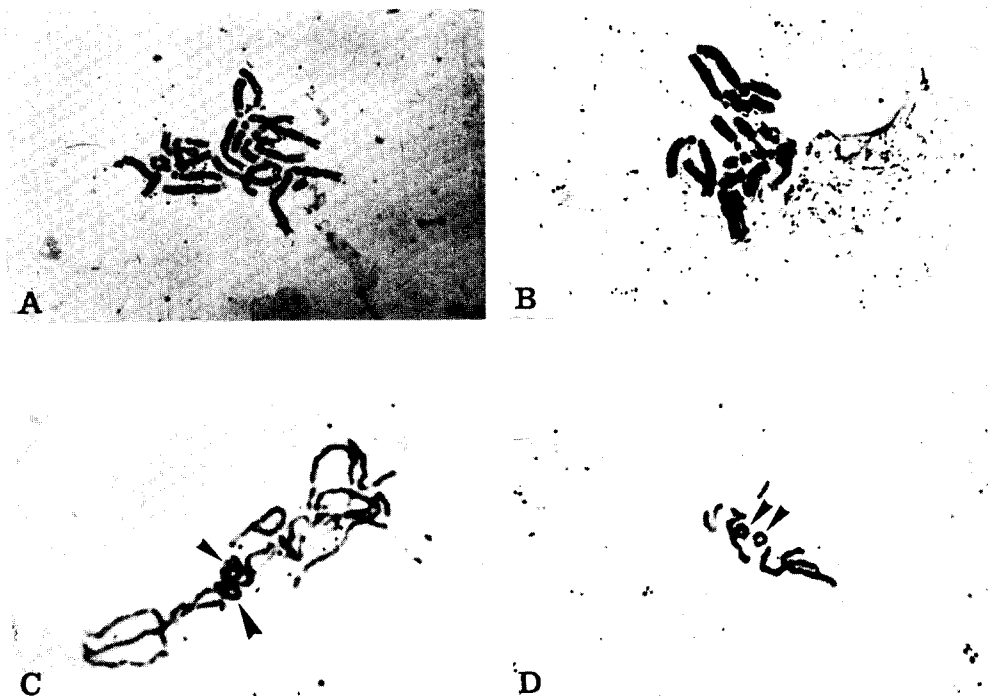


Fig. 2. Chromosomal aberrations in nucleocytoplasmic hybrid. (A) Normal metaphase derived from a normal blastula. (B) Abnormal metaphase displaying hypodiploidy. (C), (D) Hypodiploidy and several ring chromosomes (arrows).

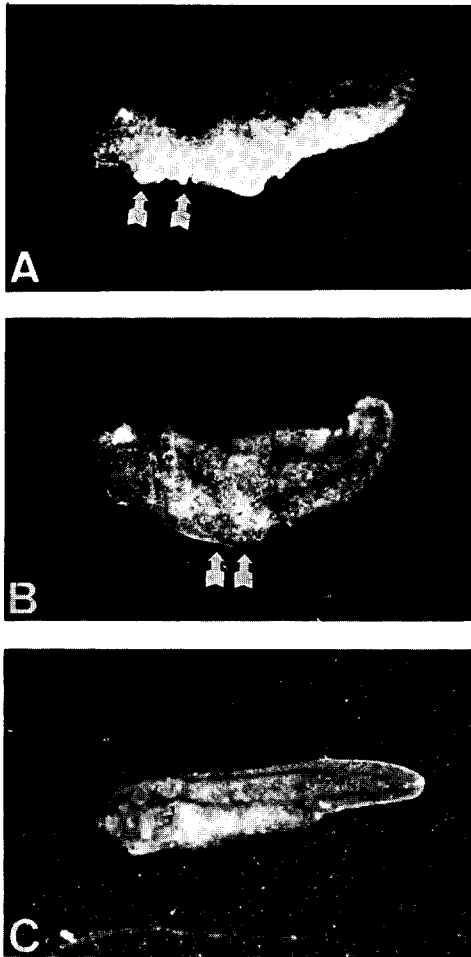


Fig. 3. Surgical grafts of presumptive ectoderm. (A) Graft of nucleo-cytoplasmic hybrid to *R. dybowskii* (arrows). (B) Control graft between normal *R. dybowskii* embryos. (C) Normal *R. dybowskii* embryo.

동이 개시된 세포핵은 본래의 조직으로 이식하여도 정상 상태로 회복되지 않는 것으로 보인다.

## 고 찰

계대핵치환은 1차 핵치환의 경우 분열속도가 느린 분화된 세포핵을 빠른 속도로 분열하는 난자에 주입한 결과 핵과 세포질간에 불화합을 초

래하게 되어 치사작용이 유발될 가능성이 있으므로 이 세포를 다른 난자에 다시 주입하여 생존율을 증가시키는데 목적을 두고 있다. 양서류의 계대핵치환의 결과 동종간에서는 제 2대 핵치환의 발생율이 증진됨이 보고되었다. (King and Briggs, 1956; DiBerardino, 1979). Nucleocytoplasmic hybrid를 donor로 계대핵치환 결과 1차 핵치환의 개체가 포배후기에 치사한테 반하여 상당수의 개체가 낭배기에 도달한다. 그러나 이들 개체도 낭배기에 100% 치사현상을 나타내어 발생수행능력에 근본적인 향상이 없었음을 나타내었다. 그러나 15대째까지 계대핵치환을 한 결과 이중 세포질에 계속 노출된 핵이 포배단계까지는 발생을 수행하는 점으로 보아 DNA의 복제와 세포분열 능력은 상실되지 않는 것으로 보인다. 이때 수정에서 포배까지는 적어도 12회 이상의 DNA 복제와 세포분열을 일으키므로 200회 이상의 분열을 끝낸 후까지 그 능력이 감소하지 않는다는 사실은 현단계에서 nucleocytoplasmic hybrid 개체를 성체까지 발생시키는 일은 성공하지 못하였으나 초기 발생단계의 지속적인 유지는 가능하다는 점을 시사해주고 있다. 그러나 비정상적인 DNA복제결과 부분적 난할을 일으킨 포배가 상당수 관찰되며 부분할 상태로 유지되다가 결국은 세포질 분해를 일으키는데 이 시기는 낭배까지 이른 hybrid 개체의 치사시기와 일치한다 (Hennen, 1965; McKinnell, 1972).

치사의 원인은 유전자의 이상활동 외에도 염색체의 복제에서 찾아볼 수 있다. 즉 치사 직전 포배기의 핵형을 분석하여 보면 비정상적인 염색체 수와 형태가 다수 관찰될 뿐만 아니라 이상발생의 정도와 비정상 염색체의 빈도가 서로 비례하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 타인의 결과 (DiBerardino, 1979)와도 유사한 것으로 비정상적인 염색체를 가진 embryo 들은 부분 난할을 일으키거나 초기에 발생이 중단된다.

## 인 용 문 헌

- Briggs, R. and T. J. King, 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:455-463

- Chung, H. M. and G. M. Malacinski, 1975. Repair of UV irradiation damage to a cytoplasmic component required for neural induction in the amphibian egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1235-1239
- DiBerardino, M. A., 1979. Nuclear and chromosomal behavior in amphibian nuclear transplantation. *Int. Rev. Cytol. (Suppl.)* **9**:129-160
- DiBerardino, M. A., 1987. Genomic potential of Differentiated Cells Analyzed by Nuclear Transplantation. *Amer. Zool.* **27**:623-644
- DiBerardino, M. A., N. O. Hoffner, and R. G. McKinnell, 1986. Feeding tadpoles cloned from *Rana erythrocyte* nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8231-8234
- Gallien, C. L., 1979. Expression of nuclear and cytoplasmic factors in ontogenesis of amphibian nucleocytoplasmic hybrids. *Int. Rev. Cytol. (Suppl.)* **9**:189-219
- Gallien, C. L., C. Aimar, and F. Guillet, 1973. Nucleocytoplasmic interactions during ontogenesis in individuals obtained by intra- and interspecific nuclear transplantation in Genus *Pleurodeles* (Urodele Amphibian). *Dev. Biol.* **33**:154-170
- Gurdon, J. B., 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpole. *J. Embryol. exp. Morph.* **10**:622-645
- Gurdon, J. B. 1969. The Transplantation of nuclei between two subspecies of *Xenopus laevis*. *Proc. Roy. Soc. London.* **173**:305-315
- Gurdon, J. B., 1986. Nuclear Transplantation in eggs and oocytes. *J. Cell Sci. (Suppl.)* **4**:278-318
- Hamburger, V., 1960. A Manual of Experimental Embryology. The Univ. Chicago Press, Chicago.
- Hennen, S., 1965. Nucleocytoplasmic hybrids between *Rana pipiens* and *Rana palustris*. *Dev. Biol.* **11**:243-267
- Hennen, S., 1972. Back-transfer of late gastrula nuclei of nucleocytoplasmic hybrids. *J. Cell Biol.* **66**:112-119
- Hennen, S., 1974. Back-transfer of late gastrula nuclei of nucleocytoplasmic hybrids. *Dev. Biol.* **36**:447-451.
- King, T. J., and R. Briggs, 1956. Serial transplantation of embryonic nuclei. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **XXI**: 271-290.
- Lee, J. K. and H. M. Chung, 1988. Studies on the regulation on gene expression by interspecific nuclear transplantation. *Korean J. Zool.* **31**:29-34.
- McKinnell, R. G., 1972. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J. Heredity* **36**:199-207.
- Shumway, W., 1940. Stage in the normal development of *Rana pipiens*. I. External form. *Anat. Rec.* **78**:139-147.

(Accepted May 10, 1989)

---

**Studies on the Improvement of Developmental Capacity of the Nucleocytoplasmic Hybrid by Nuclear Transplantation between *Rana pipiens* and *Rana dybowskii***  
Ja-Kyeong Lee and Hae-Moon Chung (Department of Biology Education,  
Seoul National University)

When diploid blastula nuclei of *Rana pipiens* are transplanted into enucleated eggs of *Rana dybowskii*, the resulting nucleocytoplasmic hybrids are lethal—those development were arrested around the stage of the dorsal lip formation.

For the improvement of developmental capacity, serial nuclear transplantation was carried out. Even though serial transplantation of 15 generations showed normal development in each generation until gastrula stage, there was no sign of fundamental improvement in development afterward. This results implied that up to gastrulation normal DNA replication and cell division can take place in foreign cytoplasm.

Since chromosomal aberrations both in shape and number were usually observed, the nuclei must have been modified while resided in the foreign cytoplasm. Those nuclei didn't participate in normal development and led the embryos to early death. Tissue graft experiment indicated that the abnormal behavior of this lethal nucleocytoplasmic hybrid is an inherent property which is not corrected by the contact with its own tissue.