

무미 양서류의 치사종간 핵치환 개체의 염색체 이상과 발생 능력에 관한 연구

이지경, 정해문

서울대학교 사범대학 생물교육과

(1990. 1. 16 접수)

포배단계의 북미산 표범개구리 *Rana pipiens*의 핵을 국내종 북방산개구리 *Rana dybowskii*의 무핵난에 이식하여 형성되는 nucleocytoplasmic hybrid 개체는 초기 낭배시기를 전후하여 치사하는 조합임이 핵치환 실험에 의하여 밝혀졌다.

이들의 치사원인이 이질세포질의 존재에 의한 일시적 현상인지 또는 발생도중 핵내에 일어난 영구적 변화에 의한 것인지를 조사하기 위한 노력의 일환으로 치사직전 개체의 염색체를 분석한 결과, 염색체의 수와 염색체의 일부분에 구조적 이상이 다양하게 관찰되었다. 따라서 이질세포질에서 DNA의 이상복제가 진행되었음을 나타내고 있으며 그 결과 비정상적 염색체를 가진 할구의 형성과 부분 난합등이 유발되어 결국 치사하는 것으로 사료된다.

또한 nucleocytoplasmic 개체의 lethality는 정상개체와의 접촉에 의해 교정되지 않는 조직의 내적 특성이 hybrid의 조직을 정상 embryo로 이식시킨 실험을 통해 명확히 밝혀졌다.

서 론

수정란이 지닌 유전자의 발현 양상은 세포내 두가지 구성요소, 즉, 핵과 세포질의 상호작용에 의하여 지배된다. 이와같은 사실은 종간잡종을 통한 고전적 발생실험과 핵과 유전자의 주입 또는 세포 융합과 같은 보다 현대적 실험 방법을 통하여 잘 알려진 바 있다.(Davidson, 1986 ; Gilbert, 1988). 핵은 유전자의 보유체로 세포내 물질대사를 지배하는 통제소로서의 기능을 수행하는 반면, 세포질은 발생의 시기 및 조직, 기관과 같은 지역에 따라 핵의 활동을 조절하는 기능을 나타낸다.

개체 발생에서 핵과 세포질의 기능을 조사할 수 있는 한 방법인 이종간의 잡종 실험은 핵의 활동이 시작되는 시기와 세포질의 영향이 유지되는 시기에 관한 많은 정보를 제공하고 있으나 계통발생상 가까운 두 종간에만 기능하다는 단점을 갖고 있다.(Fankhauser, 1955). 반면에 한종의 핵을 다른 종의 무핵 수정란에 치환시켜서 얻어지는 nucleocytoplasmic hybrid는 비교적 먼 종간에도 적용이 가능하며 이종 세포질에 접촉했을때의 핵의 활동 및 발생 양상에 관한 연구에 매우 유용하다.

양서류를 재료로한 종간 핵치환은 생존조합과 치사조합으로 대별할 수 있다. 즉, *Rana pipiens*의 두 아종사이의 종간 핵치환 경우처럼 변태를 거쳐 성체가까지의 발생이 가능한 조합을 생존조합이라

하며 (Mckinnell, 1972), 이에 반하여 *Xenopus laevis*와 *Xenopus tropicalis*의 조합과 같이 낭배기를 전후하여 치사하는 조합을 치사조합으로 분류한다 (Gurdon, 1962). 일반적으로 계통발생상의 거리가 먼 종일수록 발생수행능력이 저하되는 현상을 보이는데 이는 곤충과 포유류의 핵치환결과 (Brun, 1973)에서 동일한 결과를 나타낸다. 양서류를 재료로한 이들 치사종간 핵치환의 공통적 특징은 모든 조합에서 포배기까지는 생존이 가능하다는 점과 수정에서 낭배운동이 진행되는 기간이 정상 개체에 비해 지연된다는 점을 들 수 있다 (Gurdon, 1986).

최근 국내 서식종 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)와 북미산 표범개구리 (*Rana pipiens*) 사이의 nucleocytoplasmic hybrid가 치사조합이라는 사실이 본 연구자의 실험결과로 판명되었다 (Lee & Chung, 1988). 또한 이들의 발생수행능력의 증진을 도모하기 위하여 세포질 공여체로의 계대핵치환 (serial transfer) 및 핵 공여체로의 역핵치환 (back transfer)을 수행한 결과 근본적인 발생을 증진시킬 수만되지 않은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 치사조합의 경우 이중 세포질에서 일어난 핵의 변화가 비가역적이거나 적어도 정상상태로의 교정이 불가능하다는 사실을 시사하고 있다 (Lee & Chung, 1989).

본 연구에서는 종간잡종의 치사원인이 이질세포질의 존재에 의한 일시적 현상인지 또는 이질 세포질에서 일어난 핵내의 영구적 변화에 의한 것인지를 규명하고자 치사직전 개체의 염색체와 포배기의 조직분석을 수행하였으며 이와 병행하여 hybrid 개체의 일부를 정상개체로 조직이식시키는 실험을 수행하여 이식된 조직의 생존과 분화에의 참여 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

한국산 부미 양서류인 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)와 북미산 표범개구리 (*Rana pipiens*)를 재료로 사용하였으며 이들의 인공배란과 수정 (Hamburger, 1960; Shumway, 1940) 및 핵치환 방법 (Briggs & King, 1952)은 종전과 같은 방법으로 수행하였다.

염색체 분석

핵치환된 개체가 포배기에 도달하면, 동물반구 조직의 일부를 분리하여 0.005% colchicine에 90분간 처리한 후 10% Barth's solution에서 10분간 hypotonic treatment 하고 2.5% acetoorcein으로 30분간 염색한 뒤 압착하여 현미경으로 관찰하였다. 염색체수와 염색체의 부분적 이상유발여부는 광학현미경하에서 440배로 촬영된 사진에 의하여 판정하였다.

조직 이식

조직이식은 종전의 방법 (Chung & Malacinski, 1975, 1983) 대로 수행하였으며 이를 요약하면 다음과 같다. 사용될 embryo는 낭배초기에 manual dejelly 과정을 거쳐 3.5% cystein-HCl (pH 7.8)로 chemical dejelly 한 후, 0.2% papain에 2분간 처리하여 vitelline membrane을 약화시키고 먼저 에리한 forceps으로 donor와 host의 vitelline membrane을 벗긴 후 적당한 크기의 외배엽성 조직 (동물반구)을 tungsten needle로 분리해내어 미리 그 부위 조직을 제거한 host에 이식한다 (Fig.1). 조직이식은 Ca^{2+} , Mg^{2+} 의 농도를 4배로 증가시킨 100% Steinberg용액 (pH 7.4)에서 수행하였다. 이식부위의 상처가 치유된 embryo는 10% Steinberg액으로 옮겨 배양하였으며 실험과정중 미생물의 감염을 방지하기 위하여 모든

Table 1. Graft of presumptive epidermis tissue of nucleocytoplasmic hybrid to normal hosts.

Donor	Host	No. of total grafts	Not take	Fate of graft		
				take but		Normal differentiation
				No differen- tiation	Abnormal differentiation	
Sham control graft						
R. pip	R. pip	15	—	—	1	14
R. dyb	R. dyb	18	—	—	2	16
Experimental graft						
Hybrid embryo ($\frac{\text{nu R. pip}^*}{\text{cyto R. dyb}}$)	R. pip	12	2	7	3	—
	R. dyb	19	—	11	8	—

* R. pip : *Rana pipiens*
 R. dyb : *Rana dybowskii*

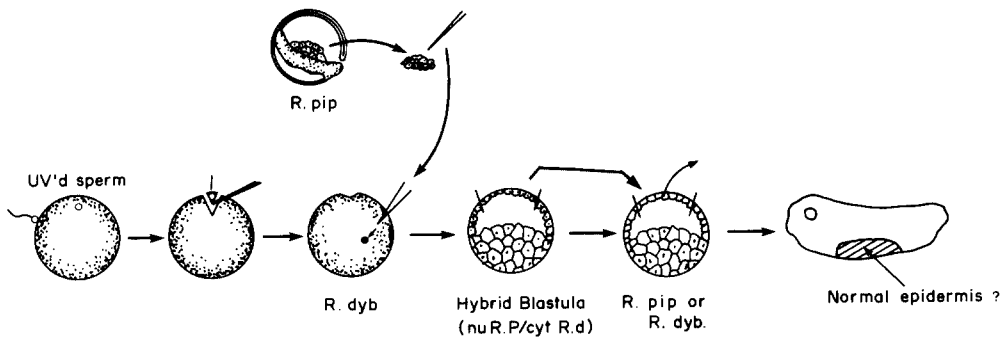


Fig. 1. Design of the surgical graft of presumptive ectoderm from its hybrid to normal control blastula.

용액은 autoclave 한 후 일정농도의 항생물질 (penicilline 0.2 mg/l, streptomycin 0.2 mg/l)을 첨가시켰다. 이상의 모든 실험은 clean bench 내에서 행했으며 초자기구는 autoclave시킨 후 사용하였다.

포배의 조직학적 검사

Nucleocytoplasmic hybrid에서 난활의 진행과 그 결과 형성된 포배강에 이상이 유발되었는지의 유무를 조사하기 위하여 포배기에 이른 난을 20% formalin에 고정하여 탈수시킨뒤 paraplant에 파라핀 유도를

기체 15 um의 두께로 절편을 만들고 Feulgen과 fast-green으로 염색한 절편을 검경하여 포배강의 형태와 위치를 관찰하였다.

결 과

종간 핵치환 개체의 염색체 분석

북미산 표범개구리 *Rana pipiens*의 포배기 핵을 국내종 북방산개구리 *Rana dybowskii*의 수정란에 종간 핵치환시킨 개체는 치사조합으로 관병되었으며, 이를 hybrid의 포배기 핵을 *Rana dybowskii*에 계대핵치환한 결과 역시 초기 낭배이상 발생이 진전되지 못함이 보고되었다(Lee & Chung, 1988, 1989). 이들의 치사원인을 조사하기 위한 방법으로 치사직전 포배의 핵형을 조사한 결과 염색체 수의 이상은 물론 염색체의 부분절단 및 환상염색체가 다수 관찰되었다 (Fig. 2). 염색체수에 이상이 일어난 경우 정상 염색체 ($2n=26$)의 일부가 소실 또는 첨가되어 aneuploidy를 나타내는 핵상이 많이 관찰되었다. 즉, 염색체수가 증가한 hyperdiploidy (Fig. 2b) 또는 염색체수가 감소된 hypodiploidy (Fig. 2c)로 나타났다. 염색체수가 감소한 경우 상동염색체 중 한개가 소실된 것도 관찰되며, 심한 경우에는 haploid인 13개 보다도 더 적은 수의 염색체가 관찰된 예도 있었다 (Fig. 2) 이와 함께 특정 염색체의 일부분에 이상이 일어난 경우도 다수 관찰되었으며 염색체의 양끝이 연결된 환상염색체도 빈번하게 나타났다 (Fig. 2 c, d).

종간 핵치환 개체의 조직학적 분석

Feulgen-fast green 염색을 통한 조직학적 연구에 의하면, 포배기에 이르면 nucleocytoplasmic hybrid

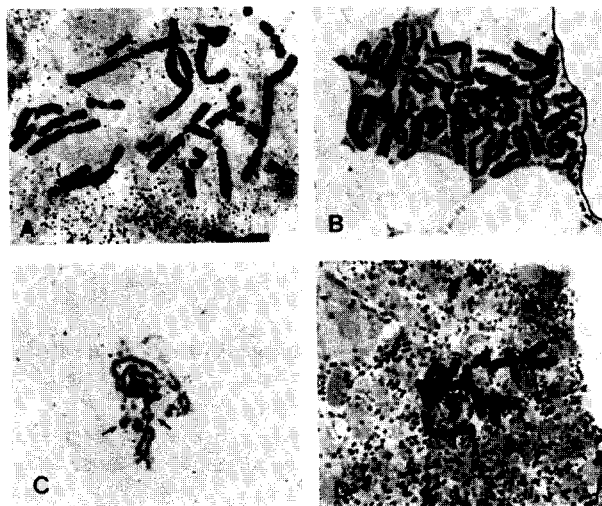


Fig. 2. Representative chromosomal aberrations observed in nucleocytoplasmic hybrid embryo. (C) (D) Abnormal metaphase displaying hypoploidy and several ring chromosomes (arrows), (B) Abnormal metaphase displaying hyperdiploidy, (A) Normal metaphase derived from a fertilized egg.

개체는 정상난에 비해 특징적인 내부구조를 나타내고 있음을 관찰할 수 있다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 동물반구의 세포층이 정상 embryo에 비해 보다 두터운 다층의 세포로 구성되어 활강의 형태, 크기, 위치에도 변화가 일어났음을 알 수 있다. 즉, 정상난에서 볼 수 있는 바와 같은 동물반구에 약간 편재된 반구형의 활강대신 불규칙한 형태의 활강이 포배의 중앙에 위치하고 있으며 활강의 크기도 정상 포배에 비하여 상대적으로 축소되어 있음을 보여준다 (Fig. 3). 또한 이들 hybrid 개체의 세포 분열을 보면 부분활과 같은 비정상적인 난활양상을 보이는 경우가 다수 관찰되었다.

조직 이식

본 연구에서 수행된 nucleocytoplasmic hybrid 개체들은 포배기 혹은 낭배 초기에 모두 치사하므로 내배엽, 중배엽, 외배엽의 3배엽이 형성되지 않는다. 그 결과 외배엽성 예정지역은 표피나 신경계통과 같은 조직으로의 분화 양상을 전혀 보이지 않는다. 이들 치사 개체의 각 배엽의 예정지역이 정상적인 환경하에서 분화를 일으킬 수 있는 능력을 보유하고 있는지의 여부를 조사하기 위하여, *R. pipiens*의 핵을 *R. dybowskii*의 무핵난에 치환시킨 후 치사직전의 초기 낭배로부터 외배엽 예

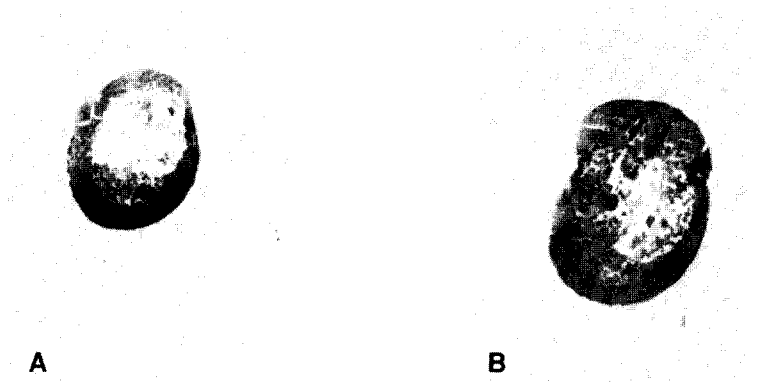


Fig. 3. Histological section of blastula embryo. (A) Normal embryo, (B) Nucleocytoplasmic hybrid embryo. Note thick layer on the animal hemisphere and small size blastocoel located in the center of the embryo.

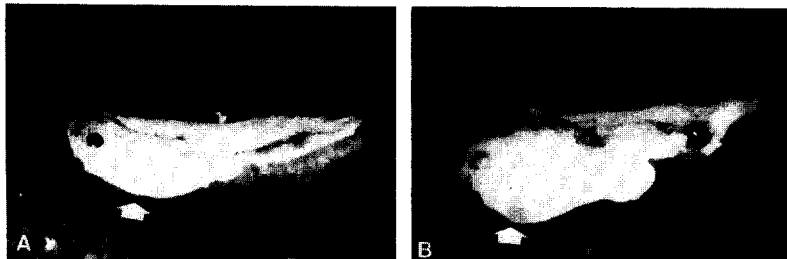


Fig. 4. Surgical grafts of presumptive ectoderm to the animal hemisphere. (A) Control graft between normal *Rana dybowskii* embryos. (B) Graft of nucleocytoplasmic hybrid to *Rana dybowskii*. Arrows indicate the grafted area. Note abnormal epidermis of the grafted area.

정지역을 다시 *R. pipiens*와 *R. dybowskii*의 초기 낭배의 같은 지역으로 조직이식 시켰다. 표1은 이들의 조직이식 결과를 나타낸 것으로 두 경우 모두 이식된 조직은 이식 직후 host에 정상적으로 치유되어 조직분화에 참여하는 것처럼 보이나 그 후 발생이 진행됨에 따라 host 조직에 비하여 주름이 잡히는 등 정상적인 표피로 분화되지 못하고 비정상적인 형태를 나타낸다. 이식된 조직은 유생단계에 이르면 모두 소멸되어 host 조직으로 완전히 대체된다 (Fig. 4). 이와는 대조적으로 같은 종간의 조직이식 실험을 한 sham control에서는 이식된 표피 예정 지역이 host의 표피에 정상적으로 참여하는 것을 알 수 있다.

고 찰

동종의 세포핵을 무핵난으로 치환시킬 때 분화된 핵일수록 발생수행능력이 저하되어 완전한 성체까지 발생하지 못하는 이유는 확실히 밝혀진 바 없으나 donor핵과 recipient 세포질 사이의 분열속도의 차이를 그 주된 원인으로 보고 있다 (Gurdon, 1986). 즉, 분열속도가 매우 느리거나 혹은 분열을 완전히 정지한 분화된 세포의 핵을 분열이 왕성한 시기인 수정란의 세포질로 주입하게 되므로 핵과 세포질 상호간의 불화합 (incompatibility)을 초래하여 DNA 복제가 완성되기 이전의 핵분열과 같은 DNA 복제등에 이상을 유발하여 개체를 치사시키는 것으로 보인다. 이종간의 핵치환에서는 치사조합의 경우 포배기에서 부화기 사이에 발생이 정지되는데, 이들의 치사 원인은 대략 두 가지로 설명이 가능하다. 첫째는 치환된 핵에 비가역적인 변화가 일어났을 가능성이고 둘째는 치환된 핵과 세포질 사이의 기능적 비양립성이다 (Gallien, 1979). 치사직전의 nucleocytoplasmic hybrid의 핵에서 염색체의 절단과 다른 염색체로의 유착 및 환상염색체가 다수 관찰되며 심한 숫적 변이가 나타나는 것으로 보아 이종세포질 내에서의 DNA 복제가 비정상적으로 일어남을 알 수 있다. 비정상적인 DNA의 복제에 의한 부분적 난환을 일으킨 포배가 상당수 관찰되며 그 결과 비정상적인 할당의 형성과 이상 낭배운동을 일으켜 개체의 치사를 초래하는 것으로 사료된다 (Hennen, 1965). 완전히 분화된 세포핵을 사용한 동종간의 핵치환의 경우에도 위와 같은 다양한 염색체 변이가 관찰되며 그 정도 및 양상에 따라 핵치환된 개체의 이상발생정도가 결정됨이 이미 보고된 바 있다 (DiBerardino, 1979).

이에 반하여 신경배 이후까지 발생이 가능한 *Rana pipiens*와 *Rana sylvatica*의 nucleocytoplasmic hybrid 조합의 경우에는 그 이후에 일어나는 치사의 원인이 염색체의 손상이 아닌 그 외의 2차적인 원인으로 보고 있다. 이 경우 2차적인 원인이라 함은 세포질이 유전자를 activation시키지 못하거나 gene product와 세포질과의 비양립성을 의미하는 것으로 사료된다 (Hennen, 1974 ; Gurdon, 1986).

본 실험에서 택한 초기 치사조합의 hybrid 개체 (*R. pipiens*, *R. dybowskii*)의 외배엽 예정지역의 분화능력 유무 여부를 조사한 조직이식 실험의 결과는 이식된 hybrid의 조직이 host의 조직에서 단기간의 생존의 연장이 가능하나 host 조직과의 조화에 의한 분화를 일으키지 못하고 종국적으로 소멸됨을 나타내었다. 이는 nucleocytoplasmic hybrid 개체의 비정상적 발생과 치사 현상이 정상 조직과의 접촉에 의해 회복되거나 변화하지 않는 hybrid 조직 자체가 갖는 내적 특성임을 보여준다. Hennen(1974)은 lethal hybrid의 dorsal lip 지역을 정상개체의 다른 부위로 이식한 경우 2차 축이 형성되지만 이때의 2차 축은 hybrid의 전형적인 외형상의 특징인 large sucker를 나타냄을 보고 하였다. 이는 unclocytoplasmic hybrid의 핵과 세포질 사이의 incompatibility는 정상 host에 의해 교정되지 않는 내적 요인임을 분명히 밝힌 결과로 본 연구의 결과와 일치한다. 또한 본 실험의

조직이식 결과는 *R. pip* → *R. dyb* 조합의 핵을 다시 *R. pip*로 역핵치환시켰을때 정상발생이 회복되지 않음을 들어 이중세포질에서의 유전자 활동변화가 비가역적임을 보고한 Lee & Chung (1988, 1989)의 이전의 보고를 뒷받침하고 있다.

REFERENCES

1. 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.
2. Chung, H.M. and G.M. Malacinski, 1983. Reversed of developmental competence in inverted amphibian eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 73: 207-220.
3. Davidson, E., 1986. *Gene Activity in Early Development*. Academic Press, New York.
4. Gilbert, S.F., 1988. *Developmental Biology*. 2nd ed. Sinauer.
5. Briggs, R. & T. King, 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 38: 455-463.
6. DiBerardino, M.A., 1979. Nuclear and chromosomal behavior in amphibian nuclear transplantation. *Int. Rev. Cytol.* 1(Suppl.) 9: 129-160.
7. Frankhauser, G., 1955. The role of nucleus and cytoplasm. In: *Analysis of Development*. (Willer, B.H., P.A. Weiss, and V. Hamburgers, eds.), Philadelphia, Saunders, pp. 126-150.
8. Gallien, C.L., 1979. Expression of nuclear and cytoplasmic factors in ontogenesis of amphibian nucleocytoplasmic hybrids. *Int'l. Review of Cytology* (Suppl.) 9: 189-219.
9. Gurdon, J.B., 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Emb. Exp. Morph.* 10: 622-645.
10. Gurdon, J.B., 1986. Nuclear Transplantation in eggs and oocytes. *In: Journal of Cell Science* (Suppl). 4: 287-318.
11. Hamburger, V., 1960. *A Manual of Experimental Embryology*. The Univ. Chicago Press, Chicago.
12. Hennen, S., 1965. Nucleocytoplasmic hybrids between *Rana pipens* and *Rana palustris*. *Devel. Biol.* 11: 243-267.
13. Hennen, S., 1974. Back-transfer of late gastrula nuclei of nucleocytoplasmic hybrids. *Devel. Biol.* 36: 447-451.
14. 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.
15. Mekinnell, R.G., 1972. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J. of Heredity.* 36: 199-207.
16. Shumway. W., 1940. Stage in the normal development of *Rana pipiens*. I External form. *Anat. Rec.* 78: 139-147.

Studies on the Chromosome Aberration and the Developmental Capacity of the Lethal Nucleocytoplasmic Hybrid between Anuran Species.

Ja-Kyeong Lee and Hae-Moon Chung

*Department of Biology Education
Seoul National University
Seoul 151-742, Korea*

In the case of interspecific hybrids between *Rana dybowskii* and *Rana pipiens* (R. pip. Nu→R. dyb. Cyto), development was arrested around the stage of dorsal lip formation.

In order to investigate the cause of their lethality, chromosome of hybrid embryo was analyzed. The metaphase chromosome of lethal hybrid embryo represented many structural abnormalities such as ring chromosome and numerical aberrations. It was suggested that DNA replication in foreign cytoplasm was abnormal in this hybrids and the abnormal DNA replication lead to death of embryo due to forming abnormal cleavage.

In addition, the tissue graft experiment indicated that the abnormal behavior of the nucleocytoplasmic hybrids is an inherent property of the tissue which was not corrected by the contact with normal host.