

동물학 논문

지렁이를 모델로 한 재생연구 (Regeneration Study Using the Earthworm)



박 순 철

1984년 연세대학교 이과대학 생물학과(이학사)
 1986년 연세대학교 대학원 생물학과(이학석사)
 1992년 Indiana State University(이학박사)
 1994년-현재 중앙대학교 생명과학과(부교수)

요 약

재생에 관한 연구는 정상적인 발생 및 분화의 기작을 이해하는데 있어서 유용한 연구모델이며 재생의 기작을 규명함으로써 재생의 능력이 없는 동물에 이를 적용하고 응용할 수 있을 것으로 생각된다. 지렁이는 재생연구의 대상동물로 여러 가지 장점을 갖고 있는데 특히 뇌, 심장 등과 같은 중추기관의 재생을 연구할 수 있는 유일한 동물이라고 사료된다. 현재 지렁이에 관한 연구는 여러 방향으로 진행되고 있는데 재생아세포의 기원, 재생시 발현이 촉진되는 단백질분해효소의 특성, Hox 유전자의 발현양상 등에 관한 연구가 진행되고 있다.

서 론

지렁이는 환형동물문 빈모강 (Annelida Oligochaeta)에 속하는 동물로 일반적으로 말하는 지렁이는 대부분 신빈모목 (Neooligochaeta)에 속한다. 지렁이는

최초의 육상동물이라고 생각되고 있으며 일찍이 아리스토텔레스는 이 동물의 토양생태학적 중요성을 인식하고 “Intestine of the Earth”라고 칭하기도 하였다. 본 글은 지렁이의 환경생태학적 중요성보다는 이 동물이 갖고 있는 재생의 능력에 초점을 맞추어 재생연구 대상으로서의 지렁이의 장점과 최근까지 연구된 결과를 요약하여 쓰려고 한다.

본 론

1. 재생연구의 대상과 지렁이의 장점

수 많은 동물 중 재생의 능력을 갖고 있는 동물 중은 매우 제한적이어서 연구대상 역시 제한적일 수밖에 없는데 현재 주된 연구 대상은 플라나리아의 몸통 재생과 양서류 (axolotl, newt 및 salamander)의 사지재생이라고 할 수 있다. 플라나리아의 재생은 그 재생능력이 다른 재생동물에 비해 뛰어나지만 탈분화과정을 거치지 않고 미분화세포 (neoblast)가 재생아를 형성하여 이것의 분화에 의해 재생이 이뤄진다 (Bayascas et al., 1998; Orii et al., 1999). 또한 플라나리아는 삼배엽성 동물 중 가장 하등한 동물로 척추동물과 진화적으로 유연관계가 매우 멀다는 단점을 갖고 있다. 반면에 양서류를 이용한 사지재생연구는 이미 분화가 완료된 세포가 탈분화과정을 거쳐 배세포 (embryonic cell) 상태로 전환되어 재생아세포를 형성하며 이들은 배발생 시기에 발현되었던 형태형성유전자의 재발현에 의해 완전한 형태의 다리를 재구성한다 (Beauchemin et al., 1994; Savard and Tremblay, 1995; Torok et al., 1998). 이러한 양서류의 다리재생 기작에 관한 분자생물학적 연구는 정상적인 사지발생 및 분화의 연구에 귀중한 자료를 제공하고 있다.

재생연구의 대상으로서 지렁이는 여러 가지 장

점을 갖고 있다. 첫째로 지렁이는 다량의 개체를 저렴한 가격으로 구입할 수 있으며 배양조건이 간단하여 실험동물로 매우 경제적이다. 둘째로 지렁이의 재생은 그 소요시간이 짧다. 지렁이의 재생능력은 종에 따라 조금씩 다르지만 *Perionyx excavatus*는 잘려진 몸통부위를 14일 이내에 완전한 형태로 재생할 수 있다. 셋째로 지렁이는 잘라진 몸통 전체를 재생해야 하기 때문에 장의 상피 및 근육 층, nephridia, chloragogue tissue, 강모 등 정상적인 발생에서 서로 다른 기원을 갖고 있는 다양한 기관 및 조직을 재생하여야 한다. 그러므로 이러한 점을 이용하여 보다 광범위한 영역의 발생 및 분화기작 연구에 이용할 수 있다. 넷째로 지렁이는 양방향성 재생을 할 수 있는 가장 고등한 동물이다. 즉 지렁이는 꼬리 부분뿐만 아니라 뇌, 심장 및 생식기관을 갖고 있는 머리부분의 재생을 할 수 있는 동물이다. 그러므로 지렁이는 중추기관의 재생을 연구할 수 있는 유일한 동물이라고 할 수 있다.

2. 지렁이 재생연구 현황

위와 같은 장점에도 불구하고 지렁이의 재생에 관한 연구는 현재까지 활발히 이뤄지지 못하고 있다. 지렁이 재생에 관한 연구는 1970년대까지 상처 회복 기간동안에 나타나는 표피조직의 형태적 변화 (Burke, 1974; Moment, 1974), 절단각도와 재생마디 수의 변화 (Gates, 1950), 재생마디 수의 개체변이 (Maderson과 Salthe, 1971) 등 주로 외형관찰을 통한 기초적인 연구가 진행되어 왔다. 비교적 최근에는 절단된 giant axon의 sealing mechanism에 관한 연구보고가 있었으며 (Kranse et al., 1994; Qi et al., 1995) 지렁이 재생시 polyamine의 일종인 putrescine의 농도가 증가한다는 연구결과가 발표된 바 있다 (Hamana et al., 1995). 그러나 현재까지 지렁이의 재생기작은 분자, 세포 및 조직의 수준에서 정확히 이해되지 못하고 있다. 따라서 최근에는 지렁이 재생에 관한 기초자료를 마련하고 그에 관련된 유전자의 실체를 규명하기 위하여 이 동물의 재생과정을 형태학적 및 분자생물학적 방법을 통하여 연구하고 있다. 먼저 (그림 1)은 줄지렁이 (*Eisenia andrei*)의 꼬리 재생과정을 나타내고 있다. 꼬리 절단 후 3일 이내에 상처치유가 완성되며 이후 재생

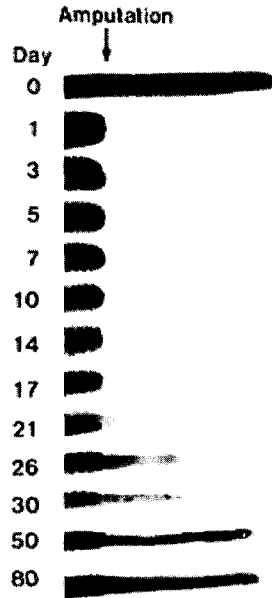


그림 1. 줄지렁이 (*Eisenia andrei*)의 꼬리 재생과정

아세포의 분열이 왕성해지기 시작해서 5일 이후에는 육안으로 관찰할 수 있는 재생아가 형성된다. 이후 재생아는 매우 빠른 성장을 하게 되고 26일 경에는 지렁이 특유의 붉은색 색소가 재생조직에 생겨나는 것을 관찰할 수 있었다.

또한 paraffin section을 이용한 조직학적 연구결과 재생아세포의 주된 기원은 지렁이 체벽의 종주근 세포인 것으로 관찰되었다 (그림 2A). 또한 재생아 세포는 각 기관으로 재분화되기 이전에 체절형성이 먼저 이뤄지는 것으로 관찰되었다 (그림 2B).

다른 동물의 재생아세포 기원에 관한 연구에 있어서 양서류 사지재생 시 탈분화되는 세포는 myofiber (Kintner와 Brockes, 1984), satellite cells (Cameron et al., 1986), cartilage (Casimir et al., 1988), dermis (Muncoka et al., 1986), nerve cells (Maden, 1977). 등 다양한 기원을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 재생아세포 형성 시 세포외기질 재구성에 관여하는 단백질분해효소에 관한 연구에 있어서 지렁이는 절단 후 24 시간 이내에 단백질분해효소의 활성이 증가하기 시작하며 이후 여러 형태의 단백질분해효소의 발현이 이뤄지는 것으로 관찰되었다 (그림 3).

특히 재생초기 뿐만 아니라 절단 후 20일 이후

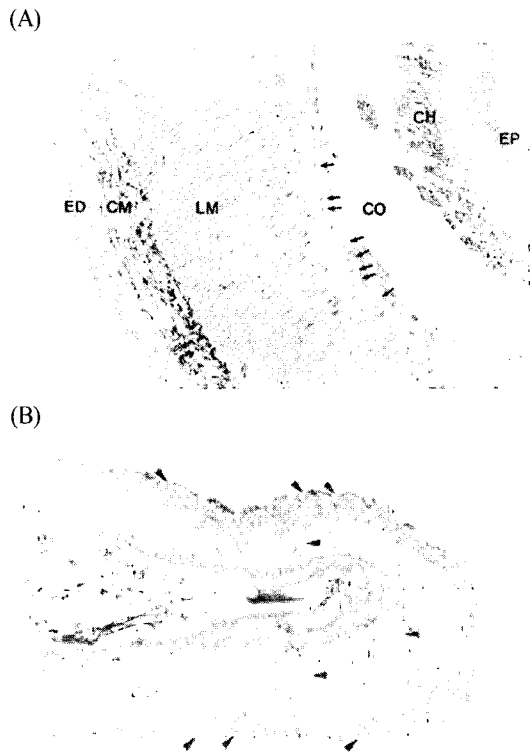


그림 2. 절단 후 1일(A)과 10일 (B)이 경과된 재생 조직

(A) 체벽 중주근층(LM)의 체강쪽에서 탈분화가 진행 중인 세포(화살표)가 다수 관찰되었다. ED: Epidermis; CM: Circular Muscle; LM: Longitudinal Muscle; CO: Coelom; CH: Chloragogue Tissue; EP: Epithelium of intestine (B) 재생아세포는 격막에 의해 나뉘어져 있으며 외부적으로도 뚜렷한 체절이 형성되어 있었다 (화살표머리).

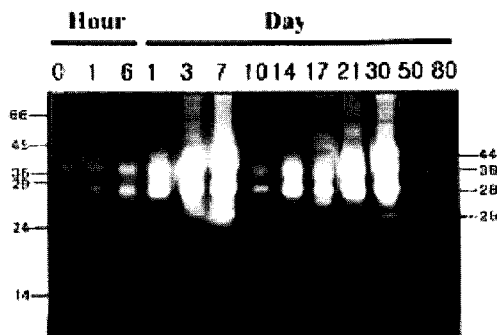


그림 3. 지렁이 꼬리 재생시 시기별 단백질분해효소의 발현 양상

표 1. 지렁이 재생 시 발현되는 단백질분해효소에 미치는 억제자의 효과

Inhibitors	Inhibition
PMSF	
5 mM	+++
1 mM	++
Aprotinin	
80 nM	++
40 nM	+
Pepstatin A	
5 mM	-
E-64	
5 mM	-
Iodoacetamide	
100 mM	-
Metal ion free-medium	-

+++ : strong, ++ : intermediate; + : weak; - : no inhibition

에도 높은 활성을 유지하고 있었다. 이러한 지렁이의 단백질분해효소는 PMSF와 Aprotinin 같은 serine proteinase 특이적 억제자에 의해 그 활성이 크게 감소하는 것으로 나타나서 지렁이 재생 초기 및 후기에 발현이 촉진되는 단백질분해효소는 serine proteinase 계통의 효소라고 생각된다 (표 1).

지렁이의 재생은 머리, 몸통, 꼬리 등 신체의 주요부분이 전체적으로 제거되었을 때 제거되지 않은 기관의 중복 발생을 억제하고 재생기관의 3차원적 패턴형성을 정확히 유지하면서 재생을 수행할 수 있는 분자생물학적 기작을 갖고 있어야 한다. 이러한 재생과정은 재생시 형성되는 재생아 세포의 positional identity를 정확하게 조절할 수 있어야 하며 재생아 세포의 positional identity가 결정되면 이에 따라 정확한 순서대로 각각의 기관이 재분화되어야 한다. 이러한 지렁이 재생에 있어서 body pattern 형성의 분자생물학적 기작은 다른 동물에서와 마찬가지로 Hox 유전자에 의해 이루어질 가능성이 크다. 지렁이 Hox 유전자에 관한 연구에 있어서는 이 유전자가 3개의 labial, 2개의 Antp 및 2개의 abd B-type을 포함하고 있다는 보고가 있었으나 그 발생학적 기능에 관해서는 논의된 바 없다 (Snow와 Buss, 1994). 최근 지렁이 Hox 유전자의 종류 및 특성에 관한 연구에서 여러 다른 형

표 2. *Perionyx excavatus* Hox (Pehox) 유전자의 상동성 비교

Pehox 1		Pehox 2		Pehox 3	
CHoxb1	92%	Brahoxy47	96%	AM-Gbx	92%
lab	84%	Sashoxs47	96%	gbx-2	88%
Ahox 1	84%	CTs-xlox	88%	GBX-2	88%
HOX A1	84%	Htr-Az	88%	Xgbx-2	88%
Hox 1.6	84%	XIHbox8b	83%	CTs-Ovxl	84%
Pehox 4		Pehox 5		Pehox 6	
hox 6/7	88%	HOX B7	96%	HOX B5	88%
CHox2.2	88%	H 90	96%	Hox b-5	88%
HOX1.1	84%	Hox 2.2	96%	HOX A5	88%
Shox 4	84%	Scr	92%	zf 21	88%
hox 5	84%	Antp	92%	R6	84%
Pehox 7		Pehox 8		Pehox 9	
HOX A7	88%	HOX D4	83%	HOX A3	80%
Hox a-7	84%	Hox d-4	83%	Hox a-3	80%
Scr	84%	CHox d4	83%	HOX D3	80%
Antp	84%	HoxD4A	83%	Hox d-3	80%
SHox a7	84%	XIHbox 4b	79%	CHox d3	80%
Pehox 10		Pehox 11			
pb	92%	HOX C6	80%		
HOX A2	88%	SHox c6	80%		
HOX B2	88%	Hox a-6	80%		
Hox a-2	88%	zf 61	80%		
CHox a2	88%	HOX A6	80%		

CHox: Chicken; H: honeybee; HOX and GBX: human; Hox and gbx: mouse; SHox: sheep; CT: annelida; Shox: sea lamprey; hox and Sashox: acorn worm; zf: zebrafish; R: rat; Ahox: axolotle; XIHbox and Xgbx: xenopus; AM: asteroid; Brahoxy: amphioxus; Htr: leech; lab, pb, Scr, Antp, are *Drosophila* genes.

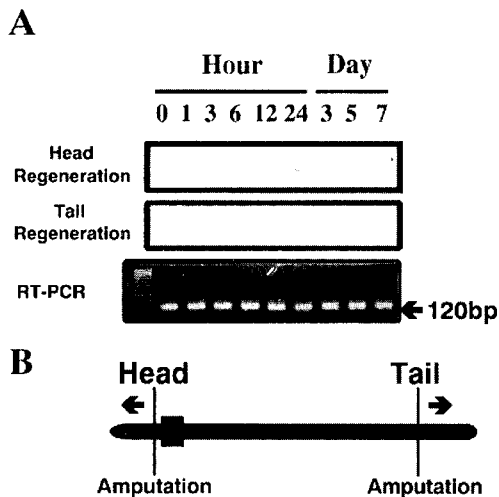


그림 4. 지렁이 labial-like 유전자의 재생 부위 및 시기별 발현양상

태의 유전자가 발견되었다 (표 2).

또한 이 중 labial 유전자와 상동성이 높은 Pehox 1을 탐지자로 이용하여 RT-PCR 및 southern blot 분석 방법을 통해 지렁이 머리 및 꼬리 재생시 그 발현양상을 관찰한 결과 재생부위 및 시기에 따라서 다른 발현양상이 관찰되었다. 즉 이 유전자는 머리재생 시에만 특이적으로 발현되었으며 그 시기도 절단 후 24시간에 국한적으로 증가하는 것으로 나타났다 (그림 4).

이러한 결과는 전술한 바와 같이 지렁이 재생시 부위에 따라 서로 다른 Hox 유전자가 body pattern 형성에 관여하고 있다는 사실을 뒷받침해 주는 결과라고 생각된다. 아울러 이 유전자의 발현이 정상적인 성체에서도 이뤄지고 있는 것으로 나타남에 따라 성체에서의 부위별 발현양상을 관찰하였다 (그림 5).

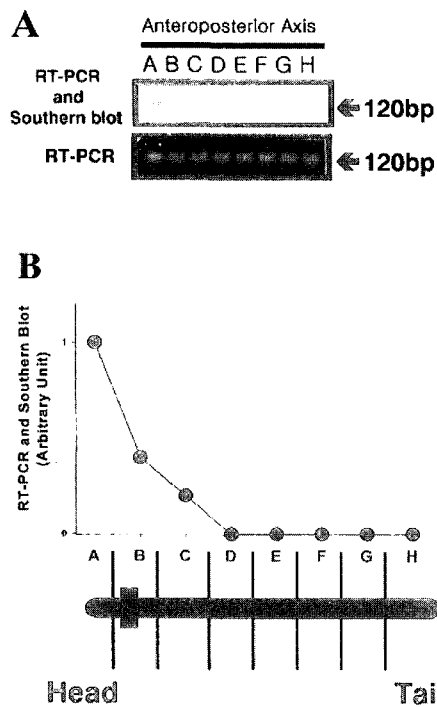


그림 5. 지렁이 *labial-like* 유전자의 성체에서의 부위별 발현

그 결과 유전자의 발현은 지렁이 환대 앞쪽 특히 구순에서 10번째 마디까지의 부위에서 매우 왕성하게 발현되는 반면 환대 이후의 뒤쪽 부분에서는 발현되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 발현양상은 (그림 4)의 결과와 함께 이 유전자가 지렁이의 전후축 형성에 중요한 역할을 하고 있음을 시사해 주고 있다.

장래전망

재생기작에 관한 연구의 궁극적인 목적 중의 하나는 이것의 분자생물학적 기전을 이해함으로써 재생의 능력이 없는 대다수의 동물에 이를 적용하고 응용해 보고자 하는 것일 것이다. 이와 같은 목적을 위해서는 “어떻게 완전히 분화된 동물세포가 역으로 탈분화될 수 있을까?”, “어떻게 잘려 나간 부분만을 정확히 재생해 낼 수 있는가?”, “어떻게 재생아세포의 재분화가 조절되는가?”와 같은 매우 기본적이고 중요한 물음에 관한 정확한 생물학적

이해가 선행되어야 할 것이다. 이를 위한 연구에 있어서 사람을 비롯한 포유류의 body pattern 형성을 조절하는 유전자의 발견이 하등한 초파리의 body pattern 형성 유전자로부터 시작되었다는 사실은 우리에게 시사해 주는 바가 크다고 할 수 있다.

앞서 기술한 바와 같이 지렁이의 재생은 여러 가지 측면에서 재생기작의 연구재료로 적합하다고 생각된다. 그러나 이 동물을 연구대상으로 한 재생 연구는 이제 시작의 단계라고 할 수 있으며 앞서 소개한 연구결과는 위 질문의 대답에 대한 기본적인 자료를 제공해 주고 있다고 사료된다. 앞으로 이 동물을 대상으로 한 재생기작연구가 보다 활발히 이뤄져서 재생의 주요단계에 관여하는 유전자의 실체가 규명되고 이를 보다 고등한 동물에 적용하고자 하는 시도가 이뤄져야 한다고 생각된다.

참 고 문 헌

Bayascas JR, Castillo E, Salo E 1998 Platyminthes have a Hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes. *Dev. Genes Evol.* 208:467-473.

Beauchemin M, Noiseux N, Tremblay M, Savard P 1994 Expression of Hox A11 in the limb and the regeneration blastema of adult newt. *Int. J. Dev. Biol.* 38:641-649.

Burke JM 1974 Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *J. Exp. Zool.* 188:49-64.

Gates GE 1950 Regeneration in an earthworm, *Eisenia foetida*. II. Posterior regeneration. *Biol. Bull.* 98:36-45.

Cameron JA, Hilgers AR, Hinterberger TJ. 1986 Evidence that reserve cells are a source of regenerated adult newt muscle in vitro. *Nature* 321:607-610.

Casimir CM, Gates PB, Patient RK, Brockes, JP. 1988 Evidence for dedifferentiation and metaplasia in amphibian limb regeneration from inheritance of DNA methylation. *Development* 104:657-668.

- Gates, GE. 1950 Regeneration in an earthworm, *Eisenia foetida*. II. Posterior regeneration. *Biol. Bull.* 98, 36-45.
- Hamana K, Hamana H, Shinozawa T 1995 Alteration in polyamine levels of nematode, earthworm, leech and planaria during regeneration. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 111:91-97.
- Kintner CR, Brockes JP. 1984 Monoclonal antibodies identify blastemal cells derived from dedifferentiating muscle in newt limb regeneration. *Nature* 308:67-69.
- Kranse TL, Fishman HM, Ballinger ML, Bittner GD 1994 Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms. *J. Neurosci.* 14:6638-6651.
- Maden M. 1977 The role of Schwann cells in paradoxical regeneration in the axolotl. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41:1-13.
- Maderson PFA, Salthe SN 1971 Further observation on tail regeneration in *Anolis carolinensis*. *J. Exp. Zool.* 177:185-190.
- Moment GB 1974 Variation and its causation in earthworm regeneration. *J. Exp. Zool.* 190:297-304.
- Orii H, Kato K, Umesono Y, Sakura T, Agata K, Watanabe K 1999 The planarian HOM/HOX homeobox genes (Plox) expressed along the anteroposterior axis. *Dev. Biol.* 210:456-468.
- Qi P, Todorova N, Todorova AT, Fendler JH, Rodziewies, GS 1995 Action potentials pass earthworm MGA segments reconnected by laser and electric field pulses. *Brain Res.* 37:189-192.
- Muneoka K, Fox W, Bryant SV. 1986 Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev. Biol.* 116:256-260.
- Savard P, Tremblay M 1995 Differential regulation of Hox C6 in the appendages of adult urodeles and anurans. *J. Mol. Biol.* 249:879-889.
- Snow P, Buss LW. 1994 HOM/Hox-type homeoboxes from *Stylaria lacustris* (Annelida: Oligochaeta). *Mol. Phylogenet Evol.* 3:360-364.
- Torok MA, Gardiner DM, Shubin NH, Bryant SV 1998 Expression of Hox D genes in developing and regenerating axolotl limbs. *Dev. Biol.* 200:225-233.