

지렁이 *labial-like* 유전자의 발현 양상에 관한 연구

조성진 · 이명식 · 허소영 · 이종애 · 박범준 · 조현주 · 박순철  
(중앙대학교 생명과학과)

Expression Pattern of *labial-like* Gene of the Earthworm, *Perionyx excavatus*

Cho, Sung Jin, Myung Sik Lee, So Young Hur, Jong Ae Lee,  
Bum Joon Park, Hyun Ju Cho and Soon Cheol Park

(Department of Life Science, Chung-Ang University)

## ABSTRACT

*Hox* genes are a family of regulatory gene encoding transcription factor that primarily play a crucial role during development. Several indications suggest their involvement in the control of cell growth and regeneration. RT-PCR and souther blot analysis revealed that *labial-like* gene was increasingly expressed along a spatial gradient in the anterior region of intact worm. During head and tail regeneration, *labial-like* gene was expressed only in the head region of regenerating body pieces, suggesting that the gene is involved in the anteroposterior patterning in earthworm. This result could give us information on the significance of *Hox* genes and the relationship between *Hox* genes during regeneration.

**Key words :** Earthworm, *Hox* genes, *labial-like* gene, Regeneration

## 서 론

대부분의 동물에 있어서 수정란은 세포 분열과 세포 운명의 분화를 통해 배아가 기본적이고 공통적으로 가지는 피부, 근육, 신경 등을 형성한다. 1980년대 초부터 이러한 일련의 과정을 조절하는 기작을 밝혀내기 위한 연구가 많이 진행되어 오고 있다(Robertis *et al.* 1990). 이러한 연구 결과 초기 배아의 각 부분을 특수화된 조직으로 분화할 수 있도록 세포들의 운명을 결정짓는 유전자군이 밝혀졌으며, 이들을 Homeotic Complex (Hom-C; *Hox*) 유전자라고 한다.

*Hox* 유전자는 발생을 조절하는 유전자 중 하나로 척추동물과 무척추동물에 있어서 초기 배 발생시 특정한 시간에 특정한 장소에서 발현하며, 몸통 전후축의 형태를 형성하는데 있어 중요한 역할을 한다(Gehring *et al.* 1994). *Hox* 유전자는 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 처음 발견되었으며 helix-turn-helix 형태의 DNA 결합부위(homeodomain)를 공유하고 있는 전사조절인자(transcription factor)로 알려져 있다. 또한 사람이나 생쥐의 경우 39개의 *Hox* 유전자가 밝혀져 있고 각각의 유전자들은 서로 다른 염색체 상에 위치해 있는 4개의 cluster (*HoxA*, *HoxB*,

*HoxC*, *HoxD*)에 존재하고 있다.

진화과정 중 homeodomain 내의 아미노산 배열순서가 잘 보존되어있기 때문에 여러 동물에서 homeobox-contain 유전자를 분리 및 동정하였다. 현재 자포동물(Schummer *et al.* 1992)로부터 사람(Levine *et al.* 1984)을 포함한 척추동물(Carrasco *et al.* 1984), 그리고 식물(Ruberti *et al.* 1991, Vollbrecht *et al.* 1991)과 균류(Shepherd *et al.* 1984, Schulz *et al.* 1990)에 이르는 넓은 범위의 분류군내에서 발견되었다. 그러므로 이를 이용하여 분류군사이의 진화상 계통분류학적 연관관계의 분석에도 유용하게 이용되고 있다(Holland and Hogan 1986, Ruddle *et al.* 1994). 또한 모든 *Hox* 유전자는 발현양상에 있어서도 유사성을 나타내고 있다. 즉 3'에 위치한 유전자는 개체의 앞쪽에서 먼저 발현되고, 5'에 위치한 유전자는 뒤쪽에서 나중에 발현된다. 그러므로 모든 *Hox* 유전자는 전후축(anteroposterior body axis) 상에서 발현되는 동일한 순서에 따라 염색체 DNA 상에 배열되어있다. 또한 모든 척추동물의 homeobox complex는 각각 다른 염색체상에 위치하고 있는 네 종류의 homeobox complexes를 가지고 있다. 이러한 multi complexes는 진화과정 중 무척추동물의 *Hox* 유전자의 single cluster가 복제를 통해 형성된 것이다(Holland and Garcia-Fernandez

1996). 이러한 homeodomain의 공통적인 형태의 성립은 동물계, 식물계, 균류와 같은 진핵세포 분류군의 분화보다 먼저 이루어졌다(Burglin 1994).

현재 *Hox* 유전자는 후생동물의 배발생 과정 중 전후축상의 형태 형성에 중심역할을 하는 것이 밝혀졌다(Slack *et al.* 1993). 예를 들어 초파리와 생쥐에서 *Hox* 유전자의 돌연변이는 homeotic transformation 또는 전후축상에서 각 체절 및 부분에서 형성되는 특수한 형태의 돌연변이를 유발할 수 있다. 그러므로 *Hox* 유전자는 환형동물과 같은 다른 체절성 동물군에서도 체절의 분화와 형성에 중요한 역할을 할 것이다.

전술한 바와 같이 주요 후생동물의 분화 과정 중 *Hox* 유전자는 진화적으로 매우 잘 보존되어있기 때문에 서로 다른 분류군 사이의 *Hox* 유전자의 비교는 후생동물의 진화상계통분류학적 연관관계를 밝혀낼 수 있었다(Ruddle *et al.* 1994). 한 예로 최근의 분자생물학적 연구와 형태적 계통 발생 연구결과 다모강이 환형동물의 원시형이라는 것과 환형동물과 절지동물이 sister group이라는 이전의 계통적 가설에 의구심을 갖게 되었다(Lake 1990, Turbeville *et al.* 1991). 환형동물은 세 가지 분류군으로 이루어져 있으며, 이 중 다모강(polychaeta)은 가장 종이 많고 형태적인 다양성을 가진 분류군이고, 다른 두 분류군은 빈모강(oligochaeta)과 질강(leech)으로 나누어져 있다. 현재까지 두 종류의 다모강 개체인 *Ctenodrilus serratus* (Dick and Buss 1994)와 *Chaetopterus variopedatus* (Irvine *et al.* 1997)에서 *Hox* 유전자가 연구되었고, 질강은 신경계의 발생과정에 대한 모델 시스템으로 *Hox* 유전자가 널리 연구되어져 왔다(Irvine and Martindale 1996). 이에 반해 빈모강은 오직 한 종류(*Stylaria lacustris*)에서만 *Hox* 유전자가 연구되었다(Snow and Buss 1994).

본 연구에 사용된 팔딱이지렁이(*Perionyx excavatus*)는 계통분류학적 환형동물문(Phylum Annelida), 빈모강(Class Oligochaeta), 신빈모목(Order Neooligochaeta), 지렁이목(Family Megascolecidae)에 속하며, 하등동물과 고등동물의 중간에 위치하고 있는 동물로써 두 동물군의 특징을 모두 가지고 있는 동물이다. 또한 지렁이는 비교적 하등동물에 속하지만 머리와 꼬리 재생이 가능한 양방향성 재생동물 중 가장 고등한 동물로써 재생연구를 위한 모델시스템으로 여러 가지 장점을 가지고 있다.

앞에서 서술한 것처럼 *Hox* 유전자는 초기 배아의 형태 형성에 관여하고 있고, 또한 재생능력을 가진 동물의 재생 과정에 있어서도 재생기관의 positional identity를 결정해 줄 수 있는 유전자로 생각되고 있다. 그러므로 재생기작에 관한 연구는 정상적인 배발생 및 분화기작을 이해하는데 도움이 될 것이다. 현재 여러 가지 동물이 재생에 관한 연구에 이용되고 있는데, 척추동물에는 도롱뇽(axolotle) 및 영원(newt)의 다리 재생기작에 관한 연구가 많이 진행되

고 있고(Maden 1982), 일부 어류에서 지느러미의 재생에 관한 연구가 진행된 바 있다(Wagner and Misof 1992). 무척추동물로는 편형동물인 플라나리아의 *Hox* 유전자의 분리와 동정 및 재생기간 중 발현 양상에 관한 연구가 진행되었으며(Salo *et al.* 1997), 극피동물의 일종인 불가사리(sea star)의 재생에 관한 연구가 보고되었다(Vickery *et al.* 2001). 그러나 척추동물의 재생 능력은 사지 재생(limb regeneration)이나 지느러미와 같이 일부분에 국한되어 있어 체계적이고 종합적인 분화기작을 연구하기에 적합하지 않다. 또한 플라나리아는 성체에 이미 존재하는 미분화세포(neoblast)의 분화에 의해 재생이 이루어진다. 그러므로 이들 동물의 재생 연구를 통한 발생 및 분화기작의 연구는 한계가 있다. 이러한 것으로 보아 여러 가지 주요 신체 기관의 완전한 재생이 가능하고, 세포의 탈분화와 재분화를 통해 재생이 이루어지는 지렁이의 재생에 관한 연구는 동물의 발생 및 분화기작을 밝혀내는 좋은 모델로 생각된다.

본 연구에서는 PCR survey를 통해 빈모강인 팔딱이지렁이(*Perionyx excavatus*)에서 분리된 labial-like 유전자를 이용하여 성체의 각 부위별 labial-like 유전자의 발현 양상과 머리 재생시 시공간적인 발현 양상을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 지렁이의 배양 및 절단

본 연구에 사용한 팔딱이지렁이(*Perionyx excavatus*)는 환형동물문(Phylum Annelida), 빈모강(Class Oligochaeta), 신빈모목(Order Neooligochaeta), 낚시지렁이목(Family Megascolecidae)에 속하며, 농촌진흥청 과학연구소(수원시)에서 제공받았다. 이 중 환대가 잘 발달한 성숙한 개체만을 선택하여 마디 수가 90-110개 정도인 개체를 Park 등(1996)에 의한 방법으로 사육하였다.

### 성체 지렁이의 부위별 절단

성체에서 labial-like 유전자의 부위별 발현 양상을 알아보기 위하여 운동성이 좋은 건강한 지렁이를 선별하였다. 지렁이는 RNA 추출을 위하여 0.1% DEPC 처리용액으로 세척한 후 70% 에탄올로 소독된 면도칼을 사용하여 환대를 포함한 머리쪽을 2부분으로, 환대가 포함되지 않은 꼬리쪽을 6부분으로 절단하여 RNA를 추출하였다(Fig. 1B).

### 머리 및 꼬리 절단

머리 및 꼬리 재생시 labial-like 유전자의 발현 양상을 실험하기 위하여 Fig. 2B와 같이 각각 머리와 꼬리를 절단하여 사용하였다. 머리 및 꼬리가 절단된 개체는 peat moss가 채워진 glass petri dish에 약 30개체씩 넣은 후 위와 같

## 지렁이 *labial-like* 유전자

은 방법으로 배양하였다. 절단된 지렁이는 재생시간 경과에 따라 채취한 후 0.1% DEPC 처리용액으로 세척하고 재생 조직을 절단하였다. 위의 모든 절단과정은 해부현미경(Olym-pus) 하에서 수행하였다.

### RNA 추출 및 확인

성체 부위별 및 재생 시간대별 RNA 분리는 각 조직을 100 mg씩 취하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동시킨 뒤 Tri-reagent (Sigma) 1 ml를 첨가한 후 Glass-Taflon homogenizer (Wheaton)로 균질액을 만들었다. 균질액은 상온에서 5분간 방치한 후 chloroform 0.2 ml를 첨가하고 잘 혼합한 뒤 상온에서 다시 4분간 방치하였다. 이를  $4^{\circ}\text{C}$ , 12,000 g에서 15분간 원심분리 한 후 무색의 상층액을 분리하여 새로운 tube로 옮기고, isopropanol 500  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하였다. 이 혼합용액을  $4^{\circ}\text{C}$ , 12,000 g에서 8분간 원심분리 한 후 침전물을 75% ethanol 1 ml로 세척하여 건조시킨 뒤 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리한 3차 증류수 30  $\mu\text{l}$ 로 현탁시켰다. 추출된 RNA의 확인은 formaldehyde buffer (0.02 M MOPS, pH 7.0, 8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 만든 1% agarose-formaldehyde gel에서 전기영동을 수행하였다. 영동 후 0.5 mg/ml 농도의 ethidium bromide 용액에 30분 동안 염색하여 RNA 상태를 확인한 후 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하였다.

### cDNA 합성

추출한 RNA를 주형으로 이용하여 oligo dT<sub>15</sub> primer (500  $\mu\text{g/ml}$ , Roche) 1  $\mu\text{l}$ , total RNA 14  $\mu\text{l}$ 를 섞은 후  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 배열하여 2차 구조를 제거한 뒤, 5 $\times$  reaction buffer 10  $\mu\text{l}$ , dNTP mixture (2.5 mM each) 6  $\mu\text{l}$ , M-MLV reverse transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ , Promega) 1  $\mu\text{l}$ 를 혼합하고 최종 용량이 30  $\mu\text{l}$ 가 되도록 3차 증류수를 첨가하였다. 이 혼합액을  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 물중탕 하여 cDNA를 합성하였다.

### 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 10 $\times$  PCR buffer 10  $\mu\text{l}$ , dNTP mixture (2.5 mM each) 8  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ , TAKARA) 0.5  $\mu\text{l}$ , upstream primer (50 pM) 2.5  $\mu\text{l}$ , downstream primer (50 pM) 2.5  $\mu\text{l}$ , cDNA 2  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 후, 최종 용량이 100  $\mu\text{l}$ 가 되도록 TDW를 첨가하여 PCR 반응용액을 제조하였다. PCR은 총 30 cycle을 실시하였으며, predenaturation은  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분, cycle 당 denaturation은  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 1분, annealing은  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 1분, extension은  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 30초 동안 실시하였고, 최종적으로 final extension을  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 실시하였다.

### Probe labeling

Probe는 본 연구실에서 orthology analysis를 통해 밝혀진 *labial-like* 유전자를 클로닝하고 있는 plasmid를 사용하였다. 이 plasmid DNA 2  $\mu\text{l}$ 를 PCR Digoxygenin (DIG) Probe Synthesis Mix dNTP (200  $\mu\text{M}$ ) 8  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$  PCR buffer 10  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ , TAKARA) 0.5  $\mu\text{l}$ , upstream primer (50 pM) 2.5  $\mu\text{l}$ , downstream primer (50 pM) 2.5  $\mu\text{l}$ 와 혼합한 후 최종 용량이 100  $\mu\text{l}$ 가 되도록 3차 증류수를 첨가하여 PCR 반응용액을 제조하였다. PCR은 위의 RT-PCR과 같은 조건으로 실시하였으며, 증폭 cycle은 총 30회를 실시하였다. PCR 반응 산물은 1% agarose gel로 전기영동하여 확인하고, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)를 사용하여 gel로부터 정제한 후 probe로 사용하였다.

### Southern blot 분석

RT-PCR 반응산물은 spectrophotometer를 이용하여 순도와 농도를 측정하였고, 1% agarose gel에 각각 20  $\mu\text{l}$ 씩 loading 하여 전기영동을 한 후 DNA를 denature 하기 위해 denature solution (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)에 15분씩 두 번 교반하였다. Gel은 다시 neutralizing solution (1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 M NaCl)에 15분씩 두 번 교반한 후 Turbo Blotter system NYTRN-N (Schleicher & Schuell)을 사용하여 nylon membrane (Boehringer Mannheim)에 capillary transfer 한 뒤 5분간 1,500J로 UV crosslinking하여 membrane에 고착시켰다. 이후 DIG Easy Hyb solution (Boehringer Mannheim)에 담가  $68^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간동안 prehybridization하였다. 앞서 제작된 DIG-labeled probe는  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 denature 시킨 뒤 20  $\mu\text{l}$ 를 DIG Easy Hyb solution 5 ml에 섞은 후 prehybridization한 membrane을 담가  $68^{\circ}\text{C}$ 에서 15시간동안 hybridization하였다. 이 membrane을 0.1% SDS가 포함된 2 $\times$  SSC 용액으로 15분간 상온에서 두 번 세척한 후 다시 0.1% SDS가 포함된 0.1 $\times$  SSC 용액으로 15분간  $68^{\circ}\text{C}$ 에서 두 번 세척하였다. 이후 luminiscent detection Kit (Boehringer Mannheim)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 washing buffer (0.1 M Maleic acid, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween20)에서 5분간 세척한 후, 30분간 blocking solution (0.1 M Maleic acid, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 10% Blocking Reagent)에서 blocking하였고, 4  $\mu\text{l}$ 의 anti-DIG-AP conjugated antibody를 섞은 20 ml의 Blocking solution으로 2시간 동안 교반하였다. Membrane은 다시 washing buffer로 15분씩 두 번 세척하여 잔여 antibody를 제거한 후 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl)로 5분간 equilibration 하였다. 여기에 Disodium3-(4-methoxyspiro{1, 2-dioxetane-3, 2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl) phenyl phosphate (CSPD, 25 mM)를 detection buffer에 1 : 100으로 희석시킨 용액 1 ml을 뿌린 후 상온에서 5분간 방치한 뒤 20분간  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 이후 14시간동안 X-ray film에 감광

시킨 뒤 현상하였다.

**발현 양상의 표준화 (Normalization)**

성체에서 각 부위별 *labial-like* 유전자의 발현 양상과 머리 및 꼬리 재생시 발현 양상의 표준화는 densitometer를 사용하여 RT-PCR 결과 나타난 *Hox* 유전자들의 밴드와 southern blot 결과 나타난 밴드의 비율을 계산하였다.

**결과 및 고찰**

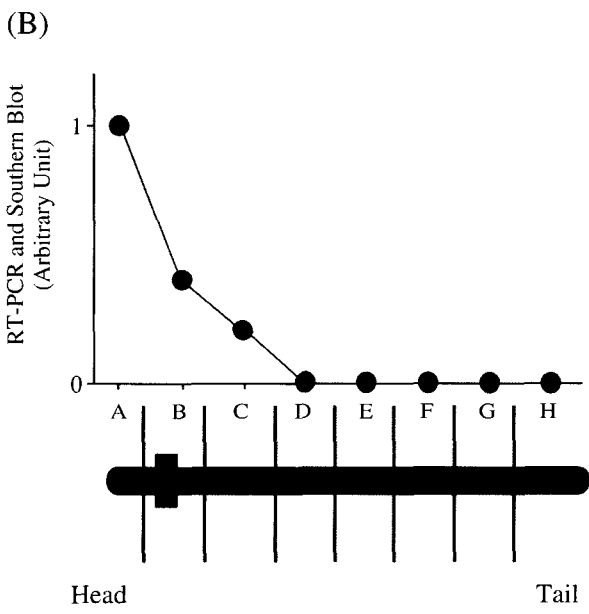
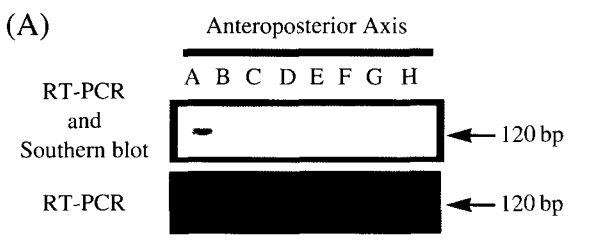
지렁이 성체에서 부위별 *labial-like* 유전자의 발현 양상 플라나리아 성체는 neoblast라고 불리는 미분화된 세포가 25-35% 존재하고 있고 (Salo *et al.* 1997), 이 미분화세포는 재생 과정 중 분열과 분화를 통해 새로운 기관을 형성

한다. 그러므로 플라나리아는 성체에서 pattern formation을 계속 유지하기 위하여 일정량의 *Hox* 유전자가 발현된다고 보고되어졌다 (Orii *et al.* 1999).

지렁이가 성체에서 부위별 *labial-like* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해서 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)과 southern blot 분석 방법을 사용하였다. 지렁이 성체는 환대를 포함한 앞쪽을 두 부분으로, 환대 아래쪽 꼬리 부분은 여섯 부분으로 절단하였고, 각 부분별 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. Southern blot에 사용된 probe는 *labial-like* 유전자를 DIG labeling하여 사용하였다. 발현 양상의 표준화(normalization)는 densitometer를 사용하여 RT-PCR 결과 나타난 *Hox* 유전자들의 밴드와 southern blot 결과 나타난 밴드의 비율을 계산하였다.

본 연구 결과 *labial-like* 유전자는 성체의 전-후축을 따라 머리에서 꼬리쪽으로 발현이 감소되는 양상으로 나타났다. *labial-like* 유전자는 머리의 가장 앞부분인 A부위에서 가장 높은 발현양상을 보였으며 B와 C부위에서는 순차적으로 발현이 감소되는 양상을 보였다. 또한 중장과 꼬리쪽 부분인 D에서부터 H부위까지는 발현이 전혀 이루어지지 않았다 (Fig. 1A).

이러한 발현 양상은 *labial-like* 유전자가 머리 부위에서 국한적으로 발현이 이루어진다는 사실을 뒷받침해 줄 수 있는 결과라고 생각되어진다. 또한 본 연구결과는 *labial-like* 유전자가 다른 동물에서와 같이 지렁이에서도 전-후축 형성에 관여하는 *Hox* 유전자 일 것으로 생각되어진다.



**Fig. 1.** 지렁이 성체에서 각 부위별 *labial-like* 유전자의 발현 양상. 지렁이는 환대를 포함한 머리쪽을 두 부분, 꼬리 쪽은 여섯 부분으로 나누어 절단하였다. Probe는 *labial-like* 유전자를 DIG-labeling하여 사용하였다. (A)는 RT-PCR과 southern blot 분석 결과를 나타낸 것이고 (B)는 절단 부위와 발현 양상을 표준화한 것이다.

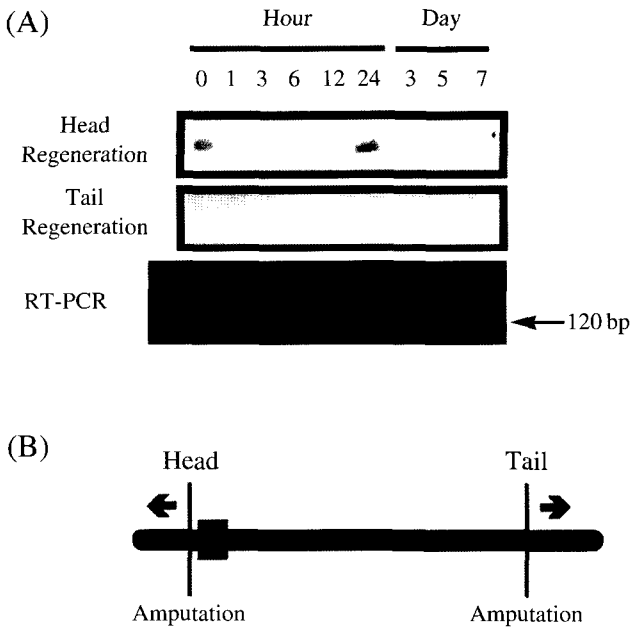
**지렁이 머리 및 꼬리 재생시 *labial-like* 유전자의 발현 양상**

*Hox* 유전자는 초기 배아의 형태 형성에 관여할 뿐만 아니라 재생능력을 가진 동물의 재생 과정에 있어서도 재생 기관의 positional identity를 결정해 줄 수 있는 유전자로 생각되고 있다. 그러므로 재생기작에 관한 연구는 배발생 및 분화기작을 이해하는데 도움이 될 것이다. 현재 플라나리아의 재생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 양상이 연구되었고 (Salo *et al.* 1997, Orii *et al.* 1999), 다모강인 *Chaetopterus* (Irvine and Martindale 2000)와 질강인 *Helobdella* (Shankland *et al.* 1997)에서 발생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 양상이 연구된 바 있다. 이러한 연구 결과, 재생 과정 중 새로 형성된 세포들에서 *Hox* 유전자의 발현은 다시 활성화되어 재생에 관여한 뒤 다시 발현이 억제될 것으로 생각된다.

이러한 *Hox* 유전자 중 초파리의 *labial* 유전자는 머리 부위를 형성하고, 사람의 *labial-type* 유전자인 PG 1 유전자들도 역시 머리 및 뇌형에 관여한다고 보고되어져 왔다 (McGinnis *et al.* 2000). 그러므로 본 연구는 지렁이 머리 및 꼬리 재생시 *Hox* 유전자의 발현 양상을 알아보기 위하여 *labial-like* 유전자를 probe로 이용하여 실험을 수행하였다.

머리 및 꼬리 재생시 *labial-like Hox* 유전자의 발현 양상

지렁이 *labial-like* 유전자



**Fig. 2.** 지렁이 머리 및 꼬리 재생시 *labial-like* 유전자의 발현 양상. 머리 재생은 환대 앞부분을 절단하였고 꼬리 재생은 꼬리에서부터 10마디를 절단하였다. 절단된 지렁이는 각각 0시간, 1시간, 3시간, 6시간 12시간, 24시간, 3일, 5일, 및 7일마다 채취하여 재생 조직을 절단하였고, RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 뒤 southern blot을 수행하였다. Probe는 *labial-like* 유전자를 DIG-labeling 하여 사용하였다. (A)는 RT-PCR 및 southern blot 분석 결과이고 (B)는 절단 부위를 나타냈다.

을 알아보기 위하여 머리 및 꼬리부분을 재생 시간대별로 채취한 뒤 재생 조직으로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. Probe는 앞에서 사용했던 DIG으로 label된 *labial-like* 유전자를 사용하였고, 발현 양상은 southern blot을 수행하여 확인하였다. 각 부위별 발현 양상은 성체에서의 발현양상을 기준으로 하여 비율을 계산하였다.

머리 재생 과정 중 *labial-like* 유전자의 발현 양상은 머리 재생 시작 후 24시간 경에만 특이적으로 발현하는 것으로 나타났고 재생 후기인 3일, 5일 및 7일에는 발현이 되지 않았다(Fig. 2A). 또한 꼬리의 재생 과정 중 *labial-like* 유전자의 발현 양상은 머리의 재생과 상반되게 재생 초기부터 재생 후기까지 전혀 발현이 이루어지지 않았다. 이러한 연구결과는 머리 및 꼬리 재생시 *labial-like* 유전자의 발현이 머리 재생에만 국한적으로 발현이 되는 것으로 보아 전-후측 형성 중 앞쪽 형성에 관여할 것으로 생각된다.

본 연구결과 *labial-like* 유전자는 지렁이 성체의 머리 부위에서 국한적으로 발현이 이루어지고 있으며, 머리 및 꼬리 재생시 머리형성과정에 관여하는 것으로 나타났다. 이러한 연구결과를 바탕으로 지렁이 재생 과정을 이해하기 위해서는 *labial* 유전자 이외에 다양한 *Hox* 유전자를 이용

하여 더 많은 연구가 필요하고, 또한 본 연구를 통하여 동물의 발생 및 분화기작을 밝혀내는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 중앙대학교 연구기자재 구입 지원프로그램의 도움을 받아 수행한 결과임.

인 용 문 헌

Burglin, T.R. 1994. A comprehensive classification of homeobox genes. In "Guidebook to the Homeobox Genes" (D. Duboule, Ed.), PP. 27-71, Sambrook & Tooze, Oxford.

Carrasco, A.E., W. McGinnis, W.J. Gehring and E.M. De Robertis. 1984. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to Drosophila homeotic genes. *Cell* **37**(2): 409-14.

Dick, M.H. and L.H. Buss. 1994. A PCR-based survey of homeobox genes in *Ctenodrilus serratus* (Annelida : Polychaeta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3**: 146-158.

Gehring, W.J., M. Affolter and T. B urglin. 1994. Homeodomain proteins. *Annual Review of Biochemistry* **63**: 487-526.

Holland, P.W.H. and J. Garcia-Fernandez. 1996. *Hox* genes and chordate evolution. *Developmental biology* **173**: 382-395.

Holland, P.W. and B.L.M. Hogan. 1986. Phylogenetic distribution of *Antennapedia*-like homeobox. *Nature* **321**: 251-253.

Irvine, S.M. and M.Q. Martindale. 1996. Cellular and molecular mechanism of segmentation in annelids. *Semin. Dev. Biol.* **7**: 593-604.

Irvine, S.Q., S.A. Warinner, J.D. Hunter and M.Q. Martindale. 1997. A survey of Homeobox genes in *Chaetopterus variopedatus* and analysis of polychaete homeodomain. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**: 331-345.

Lake, J.A. 1990. Origin of the Metazoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 763-766.

Levine, M., G.M. Rubin and R. Tjian. 1984. Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* **38**(3): 667-73.

Maden, M. 1982. Vitamins A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* **295**: 72-75.

McGinnis, W., A. Veraksa, and M.D. Campo. 2000. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Molecular Genetics and Metabolism* **69**: 85-100.

Orii, H., K. Kato, Y. Umehara, T. Sakurai, K. Agata and K. Watanabe. 1999. The planarian HOM/Hox homeobox genes (*Plox*) expressed along the anteroposterior axis. *Developmental Biology* **210**: 456-468.

Park, S.C., H.W. Park and T.J. Smith. 1996. Expression of alkaline phosphatases during embryonic development and immature stage of the earthworm, *Eisenia andrei*. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 597-582.

Robertis, E.M., G. Oliver and C.V.E. Wright. 1990. Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Scientific American* July, 26-32.

Ruberti, I., G. Sessa, S. Lucchetti and G. Morelli 1991. A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* **10**(7): 1787-91.

- Ruddle, F.H., J.L. Bartels, K.L. Bentley, C. Kappen, M.T. Murtha and J.W. Pendleton. 1994. Evolution of *Hox* genes. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 423-42.
- Salo, E., J.R. Bayascas and E. Castillo. 1997. Planarian *Hox* gene; novel patterns of expression during regeneration. *124*: 141-148.
- Schulz, B., F. Banuett, M. Dahl, R. Schlesinger, W. Schafer, T. Martin, I. Herskowitz and R. Kahmann. 1990. The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**(2): 295-306.
- Schummer, M., I. Scheurlen, C. Schaller and B. Galliot. 1992. HOM/HOX homeobox genes are present in hydra (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration. *EMBO J.* **11**: 1815-1823.
- Shankland, M., J.M. Kourakis, A.V. Master, K.D. Lokhorst, D. Nardelli-Haeffliger, J.C. Wedeen and Q.M. Martindale. 1997. Conserved anterior boundaries of *Hox* gene expression in the central nervous system of the leech *Helobdella*. *Dev. Biol.* **190**: 248-300.
- Shepherd, J.C., W. McGinnis, A.E. Carrasco, E.M. De Robertis and W.J. Gehring. 1984. Fly and frog homeodomains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* **310**(5972): 70-71.
- Slack, J.M.W., P.W.H. Holland and C.F. Graham. 1993. The zootype and phyloptic stage. *Nature* **361**: 490-492.
- Snow, P. and L.W. Buss. 1994. HOM/Hox-type homeobox from *Stylaria lacustris*. *Mol. Phyl. Evol.* **3**: 360-364.
- Turbeville, J.M., D.M. Pfeifer, K.G. Field and R.A. Raff. 1991. The phylogenetics status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequence. *Mol. Biol. Evol.* **8**: 669-686.
- Vickery, M.C., M.S. Vickery, J.B. McClintock and C.D. Amsler. 2001. Utilization of a novel deuterostome model for the study of regeneration genetics : molecular cloning of genes that are differentially expressed during early stages of larval sea star regeneration. *Gene* **262**: 73-80.
- Vollbrecht, E., B. Veit, N. Sinha and S. Hake. 1991. The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**(6315): 241-3.
- Wagner, G.P. and B.Y. Misof. 1992. Evolutionary modification of regenerative capability in vertebrates : A comparative study on test pectoral fin regeneration. *J. Exp. Zool.* **261**: 62-78.