우렁쉥이(*Halocynthia roretzi*) 유생의 뇌포 구조와 수압수용체의 형성

김정은 · 서형주 · 김길중*
강릉대학교 해양생명공학부

Brain Vesicle Structure and Formation of the Hydrostatic Pressure Receptors in Larvae of the Ascidian (*Halocynthia roretzi*)

Jung Eun KIM, Hyeong Joo SEO and Gil Jung KIM*
Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

The tadpole larvae of most ascidians have two sensory pigment cells in their brain vesicle. The anterior otolith pigment cell is sensitive to gravity, whereas the posterior ocellus pigment cell responds to light. Besides these two sensory cells, the larvae also possess another type of sensory receptor cell: hydrostatic pressure receptor (Hpr) cells. The Hpr cells have been presumed to sense hydrostatic water pressure, although no functional analysis has been performed. In larvae of the ascidian *Halocynthia roretzi*, the development of the Hpr cells and their structure in the brain vesicle are poorly understood. To investigate the morphology and formation of the Hpr cells, we established a monoclonal antibody, Hpr-1, that specifically recognizes Hpr cells. The Hpr-1 antigens became detectable in the brain vesicle at the late tailbud stage. Each Hpr cell projected a small globular body, connected by a short stalk, into the lumen of the brain vesicle. The brain vesicle showed remarkable left-right asymmetry. Pigment cells were located on the right side in the lumen of the brain vesicle, whereas Hpr cells were present in the left side. After metamorphosis, the Hpr cells were observed near the rudimental siphons of the juvenile.

Key words: *Halocynthia roretzi*, Brain vesicle, Hydrostatic pressure receptor, Hpr-1

서 론

멍게류 유생의 중추신경계는 척추동물의 경우와 마찬가지로 신경관에서 유래한다(Satoh, 1994). 멍게류 배 발생은 원장 함입 이후 신경판기, 신경배기가 진행되며, 이때 척추동물과 같은 관 모양의 중추신경계가 등쪽에 형성된다. 유생의 머리 부분에서 신경관은 팽창하여 뇌포(뇌)를 형성하고, 뇌포 후부에서 미부 말단에 이르기까지 신경삭이라 불리는 중추신경계가 형성된다. 신경삭은 상하좌우 각각 하나씩 총 4개의 세포만으로 구성되는 단일층 구조이다. 멍게류 유생의 신경발생에 관여하는 다양한 유전자의 발현 양상은 척추동물의 경우와 매우 유사하다(Corbo et al., 1997; Wada et al., 1998). 앞으로 멍게류 유생의 중추신경계 형성과 패턴화 연구가 진행되면 척추동물 신경계 발생과 진화 연구에 많은 기초 자료가 제공되리라 사료된다.

우렁쉥이(*Halocynthia roretzi*) 유생의 뇌포에는 빛을 감지하는 감각 색소세포인 안점과 중력에 반응하는 평형기가 존재한다. 이들은 멜라닌 색소를 가져 특별한 분화지표 없이도 식별이 가능하다. 색소세포의 형성에는 fibroblast growth factor에 의한 신경 유도가 선행되어야 하며 bone morphogentic protein 및 chordin 간의 길항작용이 안점과 평형기의 운명을 결정한다(Darras and Nishida, 2001). 멍게류 유생의 뇌포에 제3의 감각 신경세포로 수압수용체가 존재한다는 보고는 오래전에 있었다(Eakin and Kuda, 1971; Katz, 1983; Nicol and Meinertzhagen, 1991). 유령멍게에서 수압수용체는 섬모성세포로 각 세포에서 뇌실 안으로 돌기를 내밀고 있으며 세포질에는 많은 소포체와 골지체가 존재한다. 그러나, 유령멍게에서도 이들의 자세한 발생양식 및 정확한 기능은 알려져 있지 않다(Nicol and Meinertzhagen, 1991). 현재까지 우렁쉥이 유생에서 수압수용체와 뇌포 구조에 대한 연구는 거의 수행되지 않았다. 본 연구에서는 해양 유용생물인 우렁쉥이 유생에서 수압수용체 세포의 분화지표로서 단일클론성 항체를 만들어 수압수용체 세포의 형성과 뇌포의 구조를 조사하였다.

*Corresponding author: gjkim@kangnung.ac.kr

재료 및 방법

강원도 강릉 연안에 서식하는 자연산 및 양식산 우렁쉥이를 연구에 사용하였다. 12월초에 채집한 우렁쉥이는 수온 8℃, 24시간 형광등 조명 아래에서 사육하여 산란을 억제하였다. 각 개체를 별개의 투명용기에 담아 수온 12℃에서 7시간 이상 차광한 후, 다시 빛을 공급하는 방법으로 산란과 방정을 유도

하였다. 수정은 난자에 다른 개체에서 유래된 정자를 섞어줌으로써 조절하였다. 직경 0.45 μm 필터로 여과한 해수에 Streptomycin (50 μg/mL)과 Kanamycin (50 μg/mL)을 첨가한 후 수정란을 옮겨 저온배양기에서 13℃로 사육하였다. 수정 후 약 36시간 경에 올챙이형 유생으로 부화하였다. 부화한 유생은 2일 만에 변태하였고, 이를 3일에 한 번씩 해수를 갈아주며 13℃에서 사육하였다.

뇌포의 구조를 조사하기 위하여 부화한 유생을 Bouin 용액에 고정하여 파라핀에 포매하였다. 6 μm 두께의 연속절편을 만들어 슬라이드 글라스 위에 배열하였다. Mayer hematoxylin과 0.5% eosin으로 비교, 염색하여 Olympus BX-51 현미경으로 관찰하였다.

수압수용체 세포의 분화지표로서 단일클론성 항체 Hpr-1을 만들었다. 부화한 유생을 초음파 파쇄하여 암컷 BALB/c 쥐에 2주 간격으로 총 4회 주사하였다(Kim and Nishida, 1998). 최종 주사 3일 후, 쥐에서 비장을 적출하여 얻어진 세포를 골수종세포(PAI)와 50% polyethylene glycol을 이용하여 세포 융합하였다. 잡종세포는 HAT 배지에서 배양하였고 배양 상층액을 이용하여 간접 면역조직화학 염색법을 실시, 특이적 항체를 선별하였다.

항체 염색을 위한 유생 및 유치자(어린 개체) 표본은 -20℃ 메탄올로 10분간 고정하였다. 고정된 표본은 PBS로 세척 후, 1차 항체 반응 및 TSA Fluorescein system (Perkin-Elmer Life Sciences, USA)을 이용하여 염색하였다. 파라핀 절편에서 관찰된 구형체들이 수압수용체 세포에서 유래된 세포돌기인지 확인하기 위하여 -20℃ 메탄올로 10분간 고정한 유생을 Polyester wax (BDH Chem. Ltd., UK)에 포매한 후 6 μm 두께의 연속절편으로 만들었다. 에탄올을 이용하여 wax를 제거한 후 Hpr-1 항체 염색을 실시하였다. 표본의 관찰과 사진 촬영은 Olympus BX-51 현미경과 CoolSNAP-ProCF (Media Cybernetics) 디지털 카메라를 이용하였다.

결 과

우렁쉥이 유생의 뇌포 구조와 수압수용체의 위치

우렁쉥이 유생의 파라핀 절편들에서 안점과 평형기 및 수압수용체 세포들의 상대적 위치를 관찰할 수 있었다. 평형기는 뇌포의 중앙부에, 안점은 뇌포 후부의 뇌실벽에 위치했다(Fig. 1A,B). 우렁쉥이 유생의 뇌포는 좌우 비대칭 구조를 나타내어 색소세포들은 비교적 뇌포 좌측에 치우쳐 존재했다(Fig. 1B,C). 수압수용체로 추정되는 세포들은 평형기에서 안점에 이르는 뇌실의 왼쪽 부위가 부풀어 형성된 작은 강소에 분포하였다. 이들 세포에서 작은 세포질 줄기로 연결된 구형체가 하나씩 뇌실 안쪽으로 내밀어져 있었다(Fig. 1B',C').

Hpr-1 항체의 특이성

Hpr-1 항체는 부화한 유생에서 뇌포에 존재하는 수압수용체 세포만을 특이적으로 인식하였다(Fig. 2A). 수정란에서부터 유치자에 이르기까지 각 발생 단계에서 수압수용체 이외의 세포들은 Hpr-1 항체에 의하여 인식되지 않았다. Hpr-1 항체에 의해 염색된 수압수용체 세포는 앞서 관찰된 것처럼 평형기 부근의 좌측 뇌포 근처에 분포하였다(Fig. 2C). 이들은 뇌실에서 한 곳에 집중적으로 분포되어 있었다. 유생의 뇌포 부근 절편을 Hpr-1 항체로 염색한 결과, 파라핀 절편에서 수압수용체 세포 돌기로 시사된 구형체들이 우렁쉥이의 수압수용체 세포에서 유래된 세포질 부분임이 확인되었다(Fig. 1D,E). Hpr-1 항체는 수압수용체 세포 자체는 약하게 염색하였으나, 세포에서 뇌실로 내밀어진 구형체는 강하게 염색하였다. 또한, 우렁쉥이 유생에서 Hpr-1 항체에 의하여 인식된 세포는 16개에서 21개 사이였다.

변태 후 수압수용체 세포의 변화

Hpr-1 항원의 발현이 언제부터 시작되는지 조사하기 위하여 발생중인 배를 1시간 간격으로 고정하였다. Hpr-1 항원의 발현은 수정 후 약 28시간부터 뇌포 부위에서 관찰되었다(Fig. 3A). 이 시기는 평형기에 이어 안점의 멜라닌 색소화가 일어나는 시점이다. 다음으로 수압수용체가 유생기에만 존재하는 세포인지 변태 후에도 존재하는지를 조사하기 위하여 부화 후 3주 경과한 유치자에서 Hpr-1항원의 발현을 조사하였다. Hpr-1 항원의 발현은 입수공 및 출수공 원기 부근에서 관찰되었다(Fig. 3C). 그 아래에는 색소세포도 관찰되었다. 유치자에서 수압수용체의 염색 양상은 유생과 유사하게 구형체가 염색되었다.

고 찰

Hpr-1 항체는 우렁쉥이 유생의 뇌포에 존재하는 수압수용체 세포만을 특이적으로 인식하였다. Hpr-1 항원의 분자적 실체는 아직 규명하지 못했다. Hpr-1 항체는 수압수용체 세포에서 뇌실 안으로 내밀어진 구형의 돌기 부분을 강하게 염색했다. 이들은 유령멍게 등에서 보고된 수압수용체 세포들과 형태적으로 매우 유사했다. 유령멍게에서 돌기 부위에는 소포체와 골지체가 많이 분포하고 있다고 보고되었다(Eakin and Kuda, 1971; Katz, 1983). 최근, 우렁쉥이에서도 구형 돌기들에서 많은 소포체의 분포가 확인되었다(Taniguchi and Nishida, 2004). 이를 근거로 추정하면 Hpr-1 항체는 수압수용체 구형체의 소포체와 골지체에서 합성되는 분자를 인식하고 있을 가능성이 있다.

수압수용체 세포 특이적인 Hpr-1 항원의 발현 개시는 수정 후 약 28시간 경에 관찰되었다. 이 시기는 평형기에 이어 안점의 멜라닌 색소화가 일어나는 시점이다(Nishida and Satoh, 1989). 수온 13℃에서 수정 후 약 24시간 경에 평형기의 색소화가 일어나고, 28시간 경에 안점의 색소화가 진행된다. 따라서, 수정 후 약 30시간 경과한 유생은 뇌포의 감각세포 형성이 어느 정도 갖추어져 부화 후 유영생활에 대비하는 것으로 사료된다. 우렁쉥이는 부화 후 곧바로 유영을 하며 고착할 장소를 찾게 된다. 그러므로 뇌포에 존재하는 감각기관들은 부화 전에 완성되어야 할 것이다. Ras-MEK-MAPK 신호전달

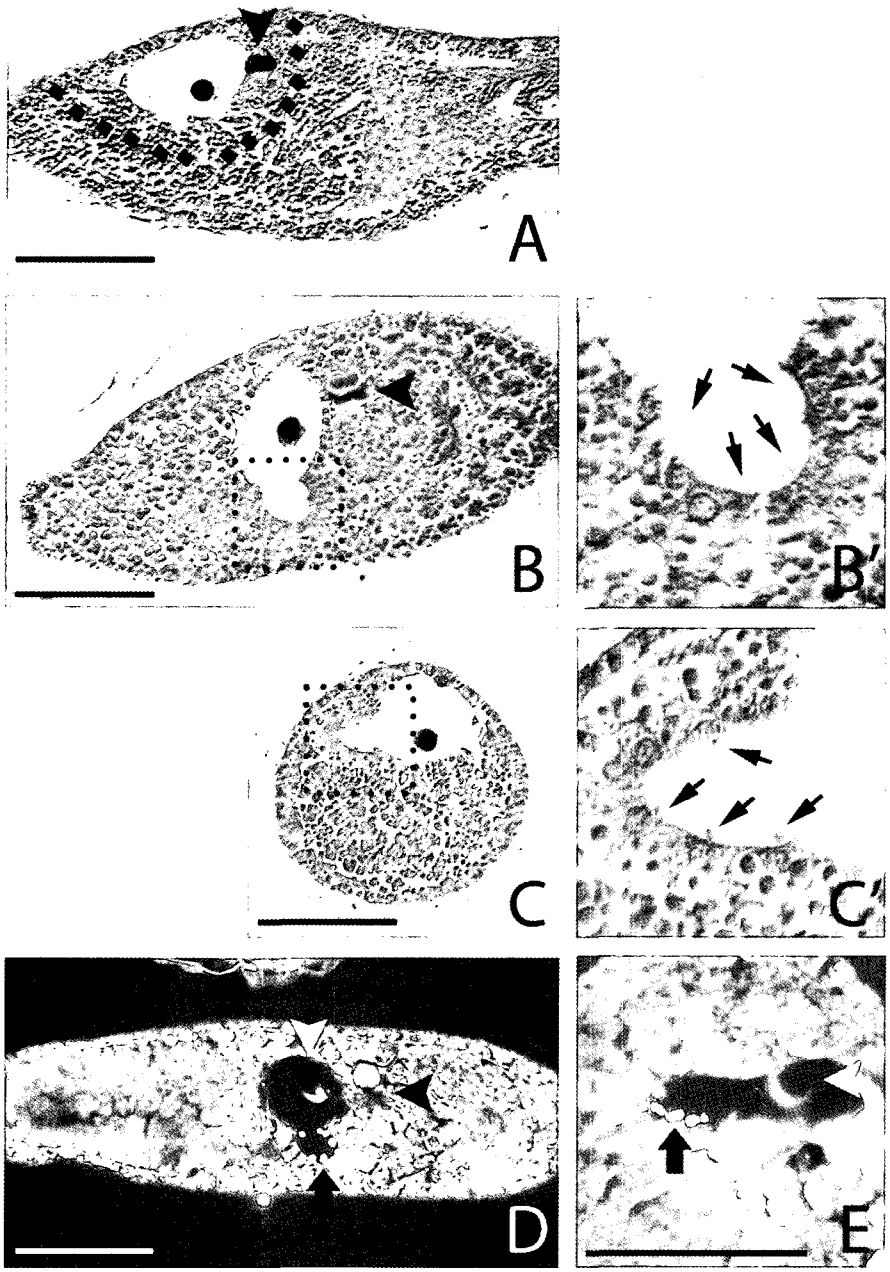

Fig. 1. The structures of brain vesicle and position of the hydrostatic pressure receptor (Hpr) cells in the tunicate tadpole, *Halocynthia roretzi*. A-C, Paraffin sections stained with hematoxylin-eosin. D and E, Immunohistochemical staining of larvae with the Hpr-1 antibody. A, A sagittal section. Broken line marks the outer area of the brain vesicle. B and D, Frontal sections. Anterior is to the left. C and E, Transverse sections of the trunk region. Dorsal is up. B' and C', High-power views of boxes in the panels B and C, respectively. In B' and C', small globular bodies (small arrows) of the Hpr cells protruded into the lumen of the brain vesicle. White arrowheads indicate otolith cells, while black arrowheads represent ocellus cells. Arrows indicate cells that are specifically recognized by the Hpr-1 antibody in the left cavity of the brain vesicle. Scale bars, 100 μm.

과정의 억제물질인 U0126을 신경배(수정 후 약 20시간)에 처리해도 수압수용체의 형성에는 영향을 미치지 못했다(Kim and Kim, unpublished data). 신경배 이전에 U0126을 처리하면 수압수용체 세포는 거의 형성되지 않는다. 안점과 평형기 색소세포의 형성에는 초기 미충형 유생기 직전까지 Ras-MEK-MAPK 신호전달 과정을 필요로 하는 것이 보고되었다(Kim,

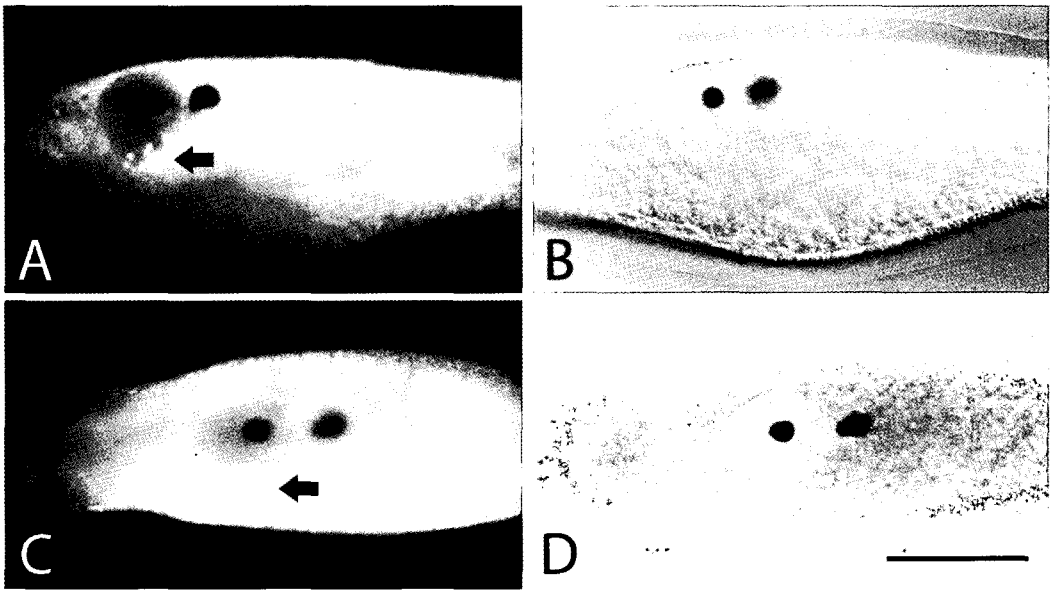

Fig. 2. Expression of the Hpr-1 antigen in *Halocynthia* larvae visualized by immunofluorescence. Anterior is to the left. A and B, Lateral views. C and D, Dorsal views. Hydrostatic pressure receptor cells that are specifically recognized by the Hpr-1 antibody in the brain vesicle are indicated by arrows. B and D, Morphology of the larvae corresponding to photos A and C, respectively. Scale bar, 100 μm.

2003). 이러한 결과는 뇌포에 존재하는 감각기관들의 형성이 후기 미충형 유생기까지는 완료되어 부화에 대비하는 것을 시사한다.

유령멍게에서 수압수용체 세포는 좌측 뇌실의 후부에서 돌기를 내밀며 존재하는 것으로 보고되었다(Nicol and Meinertzhagen, 1991). 우렁쉥이에서도 수압수용체 세포는 뇌포의 왼쪽에 위치했다. 다만 유령멍게와는 다르게 뇌포의 중간 부위에서 뇌실의 일부가 돌출되어 형성된 강소에 수압수용체 세포들이 집중되어 있었다. 색소세포들은 수압수용체와 반대로 뇌포의 오른쪽에 위치했다. 이러한 멍게류 유생의 좌우비대칭 뇌포 구조는 척추동물의 뇌와 그 진화를 이해하는데 있어 중요한 자료로 사료된다. 척추동물의 좌우비대칭 기전은 중배엽성 기관 형성에서 주로 연구되었다. 이들의 좌우비대칭 기전은 Nodal신호에 의하여 유발되는데, 최근 nodal 관련 유전자의 기능이 중추신경계의 좌우비대칭 형성에도 관여하고 있다는 것이 zebrafish에서 보고되었다(Long et al., 2003). 우렁쉥이에서 nodal 상동체 유전자가 보고되었지만 아직까지 자세한 작용 기전은 알려지지 않았다(Morokuma et al., 2002). 우렁쉥이 유생의 단순하며 명확한 좌우비대칭 뇌포 구조 연구를 통하여 인간을 포함한 척추동물의 중추신경계를 이해하는데 필요한 많은 기초자료가 얻어질 수 있을 것이다.

멍게류에서 보고된 수압수용체 세포의 정확한 기능에 대하여 아직까지 확인된 것이 없다. 형태적인 관찰로부터 어류의 뇌실에서 관찰되는 소관세포(coronet cell)와 유사하다는 보고가 있다(Rossi and Palombi, 1976; Katz, 1983). 그러나, 어류의 소관세포 역시 이온수송과 관련이 있다는 보고도 있으나 아직까지 그 기능에는 논란의 여지가 많다. 우렁쉥이 유생의 변태 후 수압수용체 세포들은 입수공과 출수공 원기 부근에서 관찰되었다. 이들이 이곳에서 어떠한 기능을 수행하는지 또는 수행하게 될지 불명확하지만, 주변 환경을 감지하여 입수공과 출수공의 개폐를 조절할 가능성이 있다. 발생학적으로 척추동물의 눈은 뇌에서 파생된 기관이다. 멍게류의 안점은 구조와 발현하는 유전자들의 종류에서 척추동물 눈의 원시적 형태로 인식되고 있다. 색소세포의 형성을 연구한 최근의 결과는 안점과 평형기가 각각 빛과 중력을 감지하여 유생의 유영과 고착 행동을 조절하고 있다는 것을 보였다(Jiang et al., 2005). 색소세포의 형성에는 tyrosinase 유전자가 필요하며 이들의 돌연변이는 빛과 중력에 반응하지 않았다. 멍게류에서 수압수용체의 기능 조사와 함께 수압수용체가 척추동물의 진화에서 어떠한 기관으로 전환되었는지 흥미있는 연구주제로 사료된다. 앞으로 수압수용체 세포의 기능을 확인하기 위하여 레이저 등을 이용한 세포제거 실험과 Hpr-1 항원의 실체 조사 및 수압수용체 세포 형성에 관한 자세한 연구가 필요하다. 수압수용체 세포들이 변태이후 우렁쉥이 몸에서 어떠한 역할을 담당하는지 여부는 앞으로 연구될 과제로 사료된다.

사 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었습니다(과제번호: KRF-2003-003-C00119). 본 연구 수행에 있어 우렁쉥이의 사육과 해수 이용에 도움을 주신 국립수산과학원 동해수산연구소 관계자 여러분께 감사드립니다.

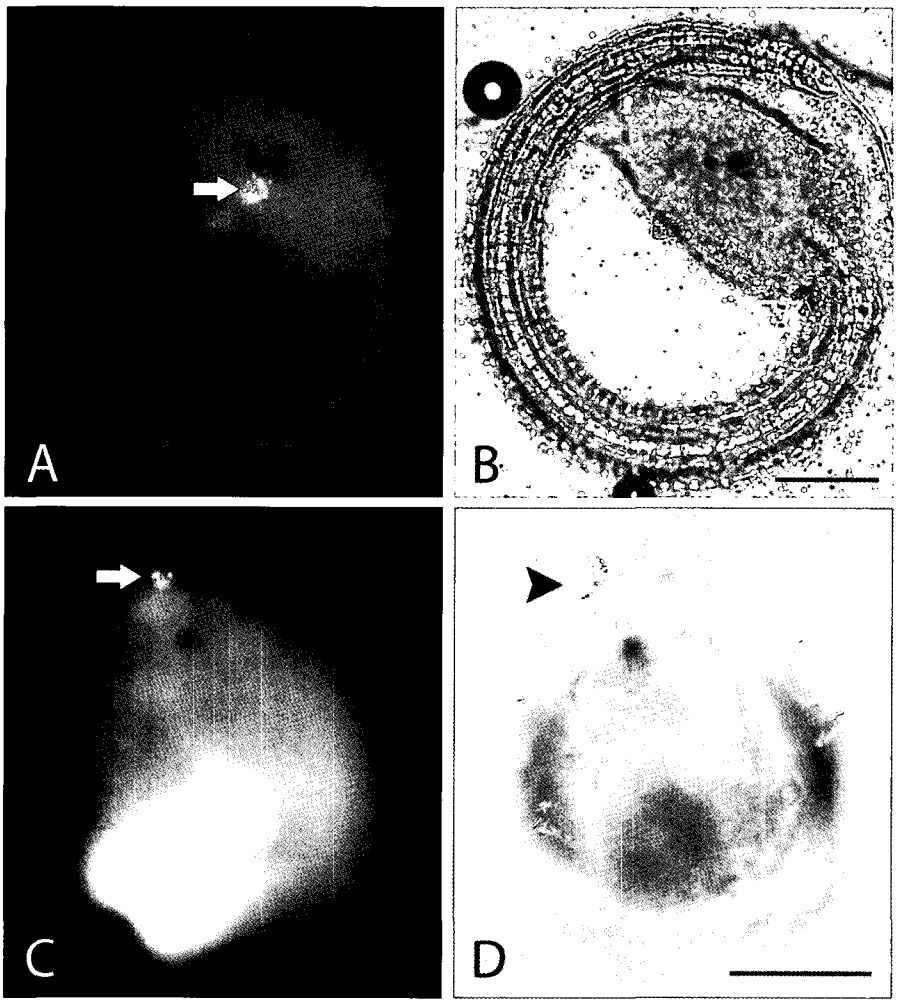

Fig. 3. Expression of the Hpr-1 antigen in *Halocynthia* specimens visualized by immunofluorescence. A, A late tailbud embryo about 28 hrs after fertilization. C, A three-weeks-old juvenile. Arrows indicate cells that express the Hpr-1 antigen. B and D, Morphology of the embryo and juvenile corresponding to photos A and C, respectively. Arrowhead indicates the rudiment of siphons. Scale bars, 100 μm.

참 고 문 헌

Corbo, J.C., A. Erives, A. Di Gregorio, A. Chang and M. Levine. 1997. Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. Development, 124, 2335-2344.

Darras, S. and H. Nishida. 2001. The BMP/CHORDIN antagonism controls sensory pigment cell specification and differentiation in the ascidian embryo. Dev. Biol., 236, 271-288.

Eakin, R.M. and A. Kuda. 1971. Ultrastructure of sensory receptors in ascidian tadpole. Z. Zellforsch., 112, 287-312.

Jiang, D., J.W. Tresser, T. Horie, M. Tsuda and W.C. Smith. 2005. Pigmentation in the sensory organs of the ascidian larva is essential for normal behavior. J. Exp. Biol., 208, 433-438.

Katz, M.J. 1983. Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*. Biol. Bull., 164, 1-27.

Kim, G.J. and H. Nishida. 1998. Monoclonal antibodies against differentiating mesenchyme cells in larvae of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Zool. Sci., 15, 553-559.

Kim, G.J. 2003. Formation of sensory pigment cells requires fibroblast growth factor signaling during ascidian embryonic development. Kor. J. Biol. Sci., 7, 221-225.

Long, S., N. Ahmad and M. Rebagliati. 2003. The zebrafish *nodal*-related gene *southpaw* is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. Development, 130. 2303-2316.

Morokuma, J., M. Ueno, H. Kawanishi, H. Saiga and H. Nishida. 2002. *HrNodal*, the ascidian *nodal*-related gene, is expressed in the left side of the epidermis, and lies upstream of *HrPitx*. Dev. Genes Evol., 212, 439-446.

Nicol, D. and I.A. Meinertzhagen. 1991. Cell counts and maps in the larval central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.). J. Comp. Neurol., 309, 415-429.

Nishida, H. and N. Satoh. 1989. Determination and regulation in the pigment cell lineage of the ascidian embryo. Dev. Biol., 132, 355-367.

Rossi, A. and F. Palombi. 1976. The saccus vasculous of *Anguilla anguilla* (L.) from larva to adult. 1. Ultrastructual modifications of the coronet cells. Cell. Tiss. Res.. 167. 11-21.

Satoh, N. 1994. Developmental biology of ascidians. In: Developmental Biology of Solitary Ascidians. Cambridge Univ. Press, New York, 11-166.

Taniguchi, K. and H. Nishida. 2004. Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Dev. Growth Differ., 46, 163-180.

Wada, H., H. Saiga, N. Satoh and P. Holland. 1998. Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: Insights from ascidian *Pax-2/5/8*, *hox* and *Otx* genes. Development, 125, 1113-1122.

2006년 2월 28일 접수
2006년 4월 24일 수리