

Retinoic Acid가 양서류난의 체절 형성에 미치는 영향

김원숙 · 정해문

서울대학교 사범대학 생물교육과

척추동물의 초기 발생에 관여하는 물질로 알려져 있는 retinoic acid(RA)를 *Xenopus* 배(embryo)에 처리한 결과, 체절의 형성에 이상 발생이 나타났다. 즉 낭배 초기에 RA에 노출된 개체의 체절은 대조군의 화살머리 모양(<<<<<) 대신 기둥 모양(IIII)을 형성하고 있었으며, 고농도일수록 직선에 가까운 모습을 하고 있었다. 신경배 시기에 노출된 개체의 체절은 정상적인 분절이 이루어지지 않았으며, 이들 이상 체절의 위치는 처리 시기에 따라 다르게 나타났으나 농도에는 영향을 받지 않았다. 그러나 분절 과정에서 일어나는 체절 세포들의 회전은 RA에 의해 억제되지 않았다. 이와 같은 결과는 체절의 형성에 분절 이전의 세포의 행동을 주도하는 프로그램과 분절을 주도하는 프로그램이 분리되어 있음을 암시한다. 한 가지 특이한 사항은 열처리 등으로 유발된 혼란이 수 개의 체절에 국한되어 나타나는 점과는 달리 RA의 처리는 어느 지점 이 후부터 모든 체절에 혼란을 야기시킨다는 점이다. 이와 같은 연속적인 분절의 혼란 현상은 RA가 다른 저해제에 의해 영향을 받는 유전자의 활동을 조절하는 전 단계의 유전자에 영향을 주기 때문인 것으로 사료된다.

또한 신경배 시기에 RA에 노출된 배의 α -cardiac actin은 정상적으로 발현되는데 비해 낭배 초기에 RA에 노출된 배는 감소된 양의 α -cardiac actin mRNA의 축적을 보였다. 그러나 EF1- α 은 RA의 처리 시기와는 무관하게 정상적으로 발현되었다.

KEY WORDS: Retinoic acid, 열처리, 체절, 체절의 분절, α -cardiac actin gene

Vitamine A 유사체인 RA는 계배의 limb bud에서 전/후 축을 세분화 하는데 관여하는 물질임이 밝혀졌다(Tickle *et al.*, 1982; Thaller & Eichele, 1987). 이와 같은 기능을 가진 RA를 *Xenopus*의 낭배에 처리하여 본 결과 신경관의 이상 발생을 유발함이 처음 보고된(Durston *et al.*, 1989) 이래로 RA가 양서류 배의 초기 발생에도 관여하는 물질이라는 많은 증거들이 제시되고 있다. 한 예로 신경관의 지역에 따른 유전자의 발현은 배의 후방으로 부터 확산되는 signal에 의해 낭배 이후 신경관 형성 시기동안 계속해서 세분화되는데 이 signal이 RA에 의해 감소되는 것으로 밝혀졌다(Sharpe, 1992). 이와 같은 연구들에 의해 RA가 양서류 배의 신경관 형성과 그 후에 일어나는 머리 부분

의 발생에 관여하는 물질임이 밝혀 졌다.

*Xenopus*의 dorsal mesoderm에서 paraxial mesoderm(somitogenic mesoderm)의 긴 능선은 convergent extension에 의해 척색의 양측에 형성되며, 이들이 분절을 일으켜 체절로 된다. 이 과정은 세포의 형태 변화와 배열에 의해 진행되며, neural fold 시기(stage 14)부터 paraxial mesoderm의 앞쪽에서 시작하여 파동과 같은 양상(wave-like fashion)으로 뒤쪽으로 전파된다(Pearson & Elsdale, 1979). 이들 체절로 될 예정 세포들은 먼저 somitomere로 organize되는데 이보다 앞 시기인 낭배 말기와 신경배 초기에 세포의 신장과 표면의 축소와 같은 형태적 변화가 선행된다.

체절이 형성되는 동안 somitomere 세포군이 체절의 단위체로 완전히 분절되고 한 체절내의 개개 세포들이 모양이 변하면서 90° 회전하기 시

본 연구는 1994년도 서울대 발전 기금 일반 학술 연구비 지원에 의해 수행되었음.

작한다. 그 결과 notochord에 직각이던 모든 세포들이 평행하게 배열하게 된다(Youn & Malacinski, 1981; Davidson, 1988).

한편 배를 전/후의 두 부분으로 절단시킨 후 각 부분을 독립적으로 발생시킨 결과 각 부분에서 원래의 체절이 형성되어(Deuchar & Burgess, 1967) 체절의 분절이 낭배 말기부터 mosaic하게 이루어짐이 알려졌다. 이와 같은 mosaic pattern의 존재는 배를 일시적으로 높은 온도에 노출시키는 heat shock 처리를 하였을 때 일정한 부위의 2-3개의 체절에서 세포가 무질서하게 배열되는 혼란(blur)을 야기시켰으나, 그 뒤쪽의 체절은 정상적으로 형성된다는 실험으로 증명되었다(Pearson & Elsdale, 1979). 열처리, actinomycin D(Chung *et al.*, 1988) 및 cyclohexamide(Jeon & Chung, 1987)에 의해 나타나는 혼란된 체절의 부위는 그 부위의 체절이 형성되기 몇 시간 전에 온도와 저해제에 민감한 anterior-posterior program이 작동하고 있음을 시사해 주고 있다.

최근의 연구로 RA가 양서류 배의 외배엽과 중배엽 모두에 영향을 준다는 증거가 제시되고 있다. 즉 낭배 초기에 RA를 처리한 경우 anterior dorsal mesoderm이 anterior axial 구조를 유도하는 능력을 잃게 됨이 보고되었다(Ruiz i Altaba & Jessel, 1991; Cho *et al.*, 1991; Sive *et al.*, 1990). 이와 함께 muscle actin의 mRNA의 축적이 RA에 의해 억제되는 것으로 나타났다(Brennan, 1992). 한편 특정 유전자와 체절 형성과의 관계를 보여주는 연구로 *Xhox-1A* 유전자의 주입에 의한 보고를 들 수 있다. 즉 *Xhox-1A* mRNA를 2 세포기의 한쪽 할구에 미세 주입하였을 때 주입된 할구로부터 발생된 체절이 무질서하게 형성되어 *Xhox-1A* gene이 체절 형성에 관여함(Harvey & Melton, 1988)을 시사하고 있다.

이에 본 연구에서는 중배엽으로부터 유래되는 체절의 형성에 RA가 어떤 영향을 미치는가를 조사하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

Xenopus 난의 채취 및 RA의 처리

*Xenopus*의 수정란의 채취 및 한천층의 제거는 종전의 방법(Jeon & Chung, 1987)을 사용하였으며, 발생 단계는 Nieuwkoop과 Faber의 방식(Nieuwkoop & Faber, 1967)에 따라 구분하였다.

RA(Type XX:All trans)는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 먼저 용해시킨 후 10^{-2} M을 저장 용액으로 만들어 -20°C 에 보관시켰다가 10% Steinberg solution에 희석하여 사용하였다. RA의 처리는 적절한 시기에 도달한 배를 각각의 농도에 30분간 노출시킨 후, 10% Steinberg solution으로 옮겨 수 회 세척한 다음 10% Steinberg solution에서 배양하였다.

α -cardiac actin 과 EF1- α probe 준비

Stage 13-14에 도달한 *Xenopus* 배를 RNA lysis buffer(4M guanidinium-isothiocyanate, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% β -mercaptoethanol)로 homogenize한 후 mAP(messenger affinity paper: Amersham)에 mRNA가 부착되게 하였다. mRNA가 부착된 mAP를 세척, 건조시킨 후 DEPC- H_2O 를 넣어 72°C 에서 5분 동안 가열하여 mRNA를 추출하였다. 추출된 mRNA를 reverse transcription reaction을 시켜 primary strand(cDNA)를 합성하였다.

얻어진 template에 upstream (5'-TCCCTGTACGCTTCTGGTCGTA-3'), downstream primer (5'-TCTCAAAGTCCAAAGCCACAATA-3'), Taq polymerase, dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.4), 1.5 mM MgCl_2 , 100 g/ml gelatin을 혼합한 후 95°C 에서 denaturation(1분), 55°C 에서 annealing(30초), 72°C 에서 extension(30초)의 과정을 50회 반복하여 cDNA를 합성하였다. 증폭된 cDNA로 digoxigenin labelled

probe를 합성하기 위하여, dig-dUTP와 dUTP를 6:4 비율로 섞은 dNTP mixture와 downstream과 upstream primer를 500:1의 비율로 넣은 후 PCR을 수행하여 dig-labelled antisense DNA probe를 합성하였다.

Whole-mount *in situ* hybridization

본 연구에 사용된 whole-mount *in situ* hybridization은 Hermmati-Brivanlou 등 (1990)의 방법을 수정한 것으로 다음과 같이 수행하였다. 적절한 시기에 도달된 배를 MEMFA (100 mM MOPS, pH 7.4; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄; 3.8% formaldehyde)에서 고정시켰다. 고정된 배를 ME (90% methanol, 10% EDTA)/PTW (1X PBS, 0.1% Tween 20) series에 넣어 수화시킨 후 4% paraformaldehyde에서 재고정시켰다. 재고정된 배를 hybridization buffer에서 prehybrid시킨 후 digoxigenin으로 표지된 probe를 포함한 hybridization buffer에서 hybrid시켰다. 항체 반응된 배를 NBT(4-Nitro blue tetrazolium chloride)와 BCIP(5-Bromo-4-cholre-3-indolyl-phosphate)로 발색 반응시켰다. 발색 반응을 마친 배가 wild type일 경우 25% PBS(pH 7.4, DEPC D.W.)로 만든 15% H₂O₂ 용액에서 표백하여 관찰하고 Kodak Plus-X Pan 필름으로 촬영하였다.

조직학적 검사

고정된 유생을 paraffin으로 포매한 후 10 μ m 두께의 절편을 제작하였다. 절편된 리본은 0.01%의 poly-L-lysine을 입힌 슬라이드 글라스에 올려 놓고 45°C로 유지시켜 표본이 슬라이드 글라스에 잘 부착되도록 하였다. 부착된 표본은 xylene에 넣어 paraffin을 제거한 후 Canada balsam으로 봉합한 후 위상차 현미경 하에서 관찰하였다.

결과

RA 처리와 α -cardiac actin 유전자의 발현

취추 동물에서 근육이적 발현 양상을 보이는 α -cardiac actin 유전자를 probe로 사용하여 RA처리에 따른 체절 및 근육의 이상 유무를 조사하였다. *Xenopus* 배에서 α -cardiac actin 유전자는 낭배 중기부터 중배엽에서만 특이하게 발현되기 시작하여 신경배 시기 이후에는 새로 형성되는 체절 및 체절로부터 유래되는 복부 근육에서 발현된다. RA에 의해 중배엽성 기관이 영향을 받는지를 조사하기 위해 낭배 초기와 신경배 시기에 각각 처리된 유생을 digoxigenin으로 표지된 α -cardiac actin DNA를 probe로 하여 whole-mount *in situ* hybridization 시켜 처리하지 않은 정상 배와 비교하였다. 그 결과 정상배에서는 α -cardiac actin mRNA가 stage 13부터 전사되는데 비해 낭배 초기에 RA가 처리된 배는 stage 14/15에서부터 나타났으며 발현의 정도가 대조군 개체에 비해 약하게 나타났다. 그러나 신경배 시기에 처리한 배들의 α -cardiac actin 유전자의 발현은 대조군과 차이가 없었다. 또한 translation factor인 EF1- α 의 발현은 RA처리 농도 및 시기와는 무관하게 정상적으로 나타났다(Fig. 1).

체절의 형성과 복부 근육 형성이 RA에 의해 영향을 받는지의 여부를 규명하기 위해 digoxigenin으로 표지된 α -cardiac actin antisense DNA를 probe로 하여 whole-mount *in situ* hybridization을 수행하였다. 그 결과 낭배 초기에 처리된 개체는 체절 및 복부 근육에서 α -cardiac actin 유전자가 대조군보다 약하게 발현되었다. 또 제2-제8 체절의 하단으로부터 유리되어 복부 중앙으로 이동하는 미래의 복부 근육 세포군의 크기가 RA로 처리된 개체의 것이 대조군에 비하여 축소된 이상 형태를 나타내었다. RA처리 개체의 복부 근육은 대조군과 같이 체절로부터 이동함을 보였으나, RA에 의해 나타난 체절의 이상 형태에 따라 복

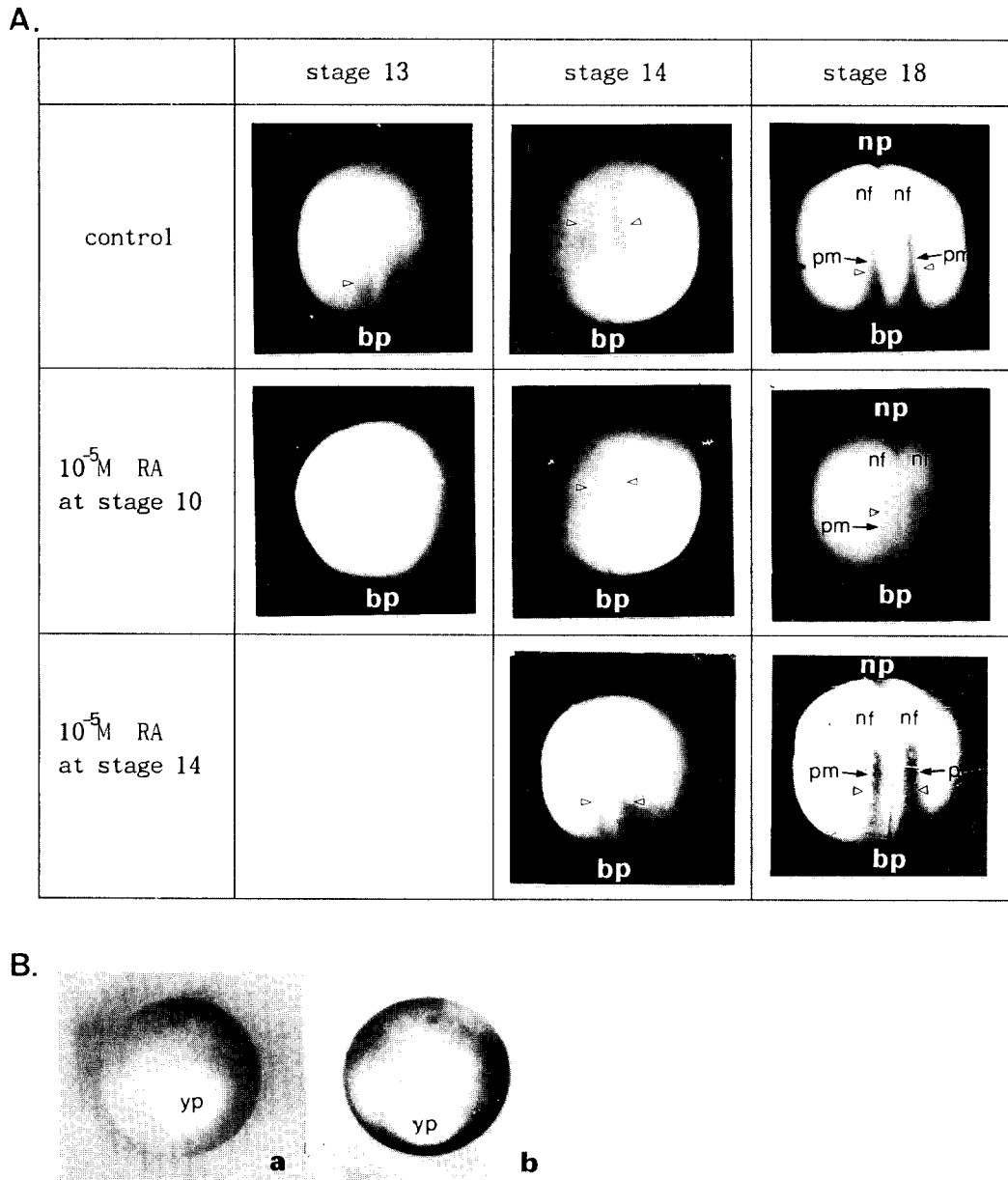


Fig. 1. A: Expression pattern of α -cardiac actin gene in *Xenopus* embryos exposed to $10^{-5}M$ RA at early gastrula stage (st.10) and early neurula stage (st.14). B: Expression pattern of EF1- α gene in *Xenopus* embryos. a: embryo treated with $10^{-5}M$ RA at stage 10. b: control. Expression patterns were studied by whole-mount *in situ* hybridization technique using dig-labelled DNA probes. Arrowheads indicate the regions where α -cardiac actin gene expression is positive. Note that EF1- α gene is expressed in the whole surface except in the yolk plug. np; neuropore bp; blastopore nf; neural fold pm; paraxial mesoderm yp; yolk plug.

부 근육의 세포들도 배열과 이동 거리등에서 대조군 개체와 차이를 보였다(Fig. 2).

RA 처리가 *Xenopus*의 체질의 형태 및 체질 세포의 회전에 미치는 영향

낭배 초기에 $10^{-5}M$ 의 RA로 30분간 처리한 배를 계속 발생시킨 결과 신경관 형성 억제 결함이 나타날 뿐만 아니라 체질에도 이상이 발생하였다. *Xenopus*의 체질은 axolotl과는 달리 그 형태가 (<<<<<)과 같이 화살머리 모양을 나타낸다. 그러나 RA에 노출되었던 유생들은 체질이 나타나기 시작하는 시기부터 후기 시기까지 (IIII)과 같은 직선적인 구획으로 나뉘어지며, 체질의 전/후 폭도 좁게 형성되었다. 같은 시기에 $10^{-6}M$ 의 RA를 처리한 유생들은 직선적 구획의 정도가 $10^{-5}M$ 의 경우보다 미약하였으며, $10^{-7}M$ 의 RA는 대조군 개체와 거의 차이 없는 체질을 형성하였다. 또한 RA의 용매제인 DMSO로 처리한 sham control의 경우 $10^{-5}M$ 의 RA에 사용된 0.1%의 농도에도 처리하지 않은 정상 대조군과 거의 차이를 보이지 않았다

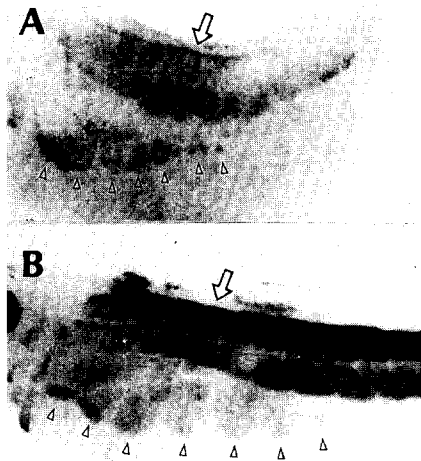


Fig. 2. Expression pattern of α -cardiac actin gene within somite and abdominal muscle. The expression pattern was studied by whole-mount *in situ* hybridization technique using dig-labelled α -cardiac actin DNA probe. A: larva treated with $10^{-5}M$ RA at early gastrula stage. B: control. Arrows and arrowheads indicate the somites and the abdominal muscle, respectively.

(Fig. 3).

RA가 체질 세포의 회전에 영향을 미치는지의 여부를 알아보기 위해서 낭배 초기와 신경배 시기에 각각 RA에 노출되었던 유생들의 체질 세포를 조직학적 검사를 통해 관찰하였다. 낭배 초기에 RA에 노출된 체질 세포들의 배열은 직선적인 구획으로 배열된 점이 다른 대조군과 같이 척색과 평행하게 배열하고 있었으며, 신경배 시기에 노출되어 blur가 일어난 부위의 세포들도 척색과 평행하게 배열되고 있어 RA가 체질 세포군의 회전을 저해하지 않은 것으로 나타

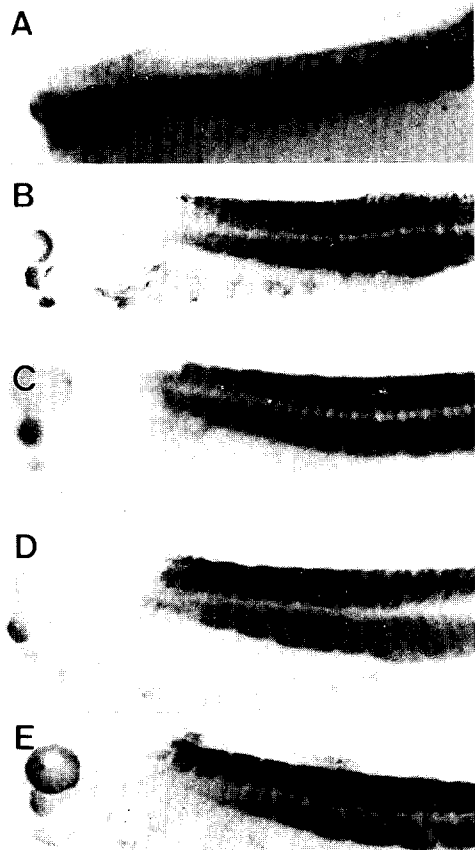


Fig. 3. Effect of various concentration of RA on the morphology of somites. Embryos were treated at early gastrula stage (st.10). A: $10^{-5}M$ RA. B: $10^{-6}M$ RA. C: $10^{-7}M$ RA. D: 0.1% DMSO. E: control. Note the rod-shaped morphology in the somites by high RA concentration of RA treatment (A,B).

났다.

RA 처리가 체질의 구획에 미치는 영향

신경배 시기에 $10^{-5}M$ 의 RA로 30분간 처리한 배는 낭배 이전에 같은 조건으로 처리된 배와 다른 양상의 체질을 형성하였다. 즉 낭배 초기에 RA에 노출된 유생들은 직선적인 체질을 갖는데 반해서 신경배 시기에 노출된 유생들은 일정한 부위의 체질이 완전하게 분절되지 않고 혼란 상태를 보이는 blur 현상을 나타내었다. 또한 혼란된 체질의 위치는 RA의 처리 시기에 따라 다르게 나타나는데 처리 시기가 늦을수록 후방의 체질에서 이상 분절이 야기되었다(Fig. 4).

고찰

척추 동물에서 α -cardiac actin gene은 근특이적으로 발현되는 유전자로 *Xenopus*에서는 낭배 중기(stage 11/12)부터 발현되기 시작하여 (Mohun, 1984 a, b; Hermarti-Brivanlou *et al.*, 1990), 신경배 시기 이후에는 새로 형성되는 체질 및 체질로부터 유래되는 복부 근육에서 발현된다(Lynch, 1990). 본 연구에서 α -cardiac actin 유전자는 낭배 초기에 RA에 노출되었던 개체에서 대조군 개체의 경우와 같이 체질 및 복부근육에서 발현되었으나, 발현의 정도가 약하게 나타났다. 즉 RA가 중배엽성 기관으로의 분화 방향을 변경시키지는 못했으나 체질 세포 및 복부근육 세포의 행동에 이상을 초래했음이 본 연구에 의하여 밝혀졌다.

*Xenopus*의 체질 모양은 axolotl과는 달리 머리에서부터 꼬리쪽으로 갈수록 기둥모양에서 화살머리 모양으로 되어 있다. Keller(1976)는 생체염색으로 체질 세포들 중에서 복측(ventral side)과 배측(dorsal side)의 세포들이 체질의 중앙에 위치하는 세포들에 비해 상대적으로 더 뒤쪽으로 이동하며, 이와 같은 상대적인 이동의 정도는 배의 뒤쪽으로 갈수록 심한 사실을 밝혔다. Youn과 Malacinski(1981)는 체질의 화살머리 모양은 중배엽과 그 위의 외배엽과의 이동

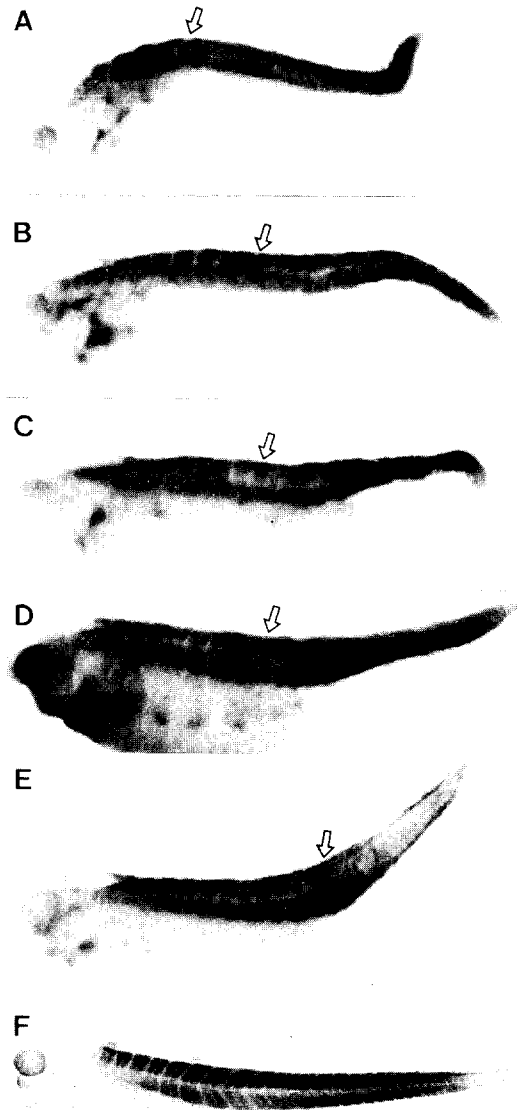


Fig. 4. Blur-formation by RA treatment at neurula stage. A: RA treatment at stage 14. B: RA treatment at stage 15. C: RA treatment at stage 17. D: RA treatment at stage 20. E: RA treatment at stage 21. F: control. Arrows indicate starting point where the blur formed. Note that more posterior somites were blurred with treatment at later stages. Also note that the blurred pattern is continuous from the starting point to the posterior end.

의 차이로 인해 나타나는 결과임을 밝혔다.

본 연구 결과에 의하면 낭배 초기에 고농도의 RA에 노출된 개체는 배의 뒤쪽 부위의 체절이 화살머리 모양을 나타내지 않아 RA가 체절 세포들의 상대적인 이동의 정도를 약화시켰음을 짐작케 한다. 그러나 체절 세포의 이동에 대한 정확한 해석을 위해서는 RA가 extracellular matrix에 영향을 주었는지에 대한 연구가 뒷받침되어야 할 것이며, 체절 세포들을 묶어두는 역할을 하는 fibronectin 이나 laminin의 분포도 함께 고려되어야 할 것이다.

또한 RA에 의해 유발된 이상 체절 및 blur가 일어난 부위의 체절 세포들의 방향이 축과 평행하게 배열되어 있어 체절 예정 세포들의 회전에 대한 프로그램은 stage 13 이전에 이미 결정되어 있으며 회전 프로그램은 RA에 의해 변경되지 않는 것으로 보인다. 그러나 신경배 시기에 RA에 노출된 개체들에서 blur 현상이 유발되는 것으로 보아 체절의 분절은 RA에 의해 방해받는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 체절의 분절이 체절 세포의 회전이나 세포의 재배열과는 또 다른 프로그램에 의해 수행되고 있음을 말해준다.

RA의 체절 구획화에 대한 영향은 신경배 후기에 RA를 처리할수록 후방의 체절 부위가 분절이 이루어지지 않았으며, 분절이 이루어지지 않는 체절의 위치는 RA를 처리할 당시보다 수 시간 뒤에 나타나는 체절에서 부터 일어났다. 위의 결과는 체절의 분절에 관계하는 물질에 대한 유전정보의 발현이 분절이 이루어지기 수 시간 전에 이미 이루어지고 있음을 의미한다.

고농도의 RA를 신경배 시기에 처리하면 일정한 부위에서 체절의 분절이 완전하게 이루어지지 않으며, 같은 시기의 배에 열처리 및 저해제를 처리해도 체절의 분절에 혼란이 나타난다. 한 가지 특기할 사항은 열처리나 cyclohexamide 및 actinomycin D 등에 의한 체절의 혼란 부위가 3-4개로 제한적(Jeon & Chung, 1987; Chung *et al.*, 1988)인데 비해 RA에 의한 체절의 혼란은 시작 부위로부터 후방의 체절에 이르기까지 연속적으로 나타난다는 점이다. <표1>

은 RA와 열처리 및 actinomycin D 처리된 배에서 나타나는 혼란된 체절 부위의 위치를 비교한 것이다.

열처리는 분절에 관여하는 유전자의 활동을 전사 수준에서 저해한다고 알려져 있으며, actinomycin D는 RNA polymerase의 이동을 방해하는 물질로 분절에 관여하는 유전자의 전사를 억제하여 분절의 혼란을 야기시키는 것으로 보인다. 그러나 RA에 의해 유도되는 체절의 혼란은 열처리나 actinomycin D 처리에 의해 유도되는 한정된 분절의 혼란 현상과는 달리 혼란이 시작된 부위에서부터 시작되어 꼬리의 끝까지 연속적으로 나타났다. 이와 같이 연속적인 분절의 혼란 현상은 RA가 다른 저해제보다 분절에 관계하는 유전자의 활동을 지속적으로 억제함을 짐작하게 한다. 즉 열처리나 actinomycin D의 처리는 처리 당시 세포내에서의 RNA 합성을 일시적으로 저해하나, RA 처리는 분절 주도 물질을 합성하는 유전자의 발현에 필수적인 요소에 영향을 주어 RA처리 이후의 이 유전자의 활동을 중지시켰을 가능성이 있다. 이 가능성은 RA가 RA receptor(RAR)와 결합하며, RAR

Table 1. Comparison of the affected somite area by the treatment of RA, heat shock and actinomycin D.

treatment stage	Position of somite														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
st. 14	----->*****														
st. 15	----->*****														
	----->														
st. 17	----->*****														
	----->														
st. 18	----->*****														
st. 20	----->*****														
	----->														
st. 21	----->*****														

--->:segmented somites, ***:blurred area by RA treatment, \\\:blurred area by heat shock treatment, |||:blurred area by actinomycin D treatment. @ Data of heat shock and actinomycin D treatments were referred from the previous report by Chung *et al.* (1988).

이 다른 유전자의 전사 조절자라는 이전의 보고 (Sharpe, 1992)와도 일치하나 이러한 가능성을 입증하기 위해서는 RA, RAR, segmentation gene의 관계등이 명확히 밝혀져야 하겠다.

인용문헌

- Brennan, S.M., 1992. Retinoic acid prevents accumulation of a mesoderm-specific mRNA in the amphibian embryo. *Mechanisms of Dev.* **38**: 17-24.
- Cho, K.W.Y., E.A. Morita, C.V.E. Wright, and E.M. De Robertis, 1991. Overexpression of a homeodomain protein confers axis-forming activity to uncommitted *Xenopus* embryonic cells. *Cell* **65**: 55-64.
- Chung, H.M., J.P. Lee, and S.K. Baek, 1988. Immunocytological approaches to the studies on somite formation in early embryo of *Xenopus laevis*. *Envir. Muta. and Car.* **8(2)**: 91-98.
- Davidson, D., 1988. Segmentation in frogs. *Development* **104**: 221-229.
- Deuchar, E.M. and A.M.C. Burgess, 1967. Somite segmentation in amphibian embryo. Is there a transmitted control mechanism? *J. Embryol. exp. Morph.* **17**: 349 - 358.
- Durston, A.J., J.P.M. Timmermans, W.J. Hage, J.F.J. Hendriks, N.J. de Vries, M. Herdeveld and P.D. Nieuwkoop, 1989. Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**: 140-144.
- Harvey, R.P. and D.A. Melton, 1988. Microinjection of synthetic Xhox-1A homeo-box mRNA disrupts somite formation in developing *Xenopus* embryos. *Cell* **53**: 687-697.
- Hermmati-Brivanlou, A., D. Frank, M.E. Bolce, B.D. Brown, H.L. Sive, and R.M. Harland., 1990. Localization of specific mRNA in *Xenopus* embryos by whole mount *in situ* hybridization. *Development* **110**: 325- 330.
- Jeon, S.H., and H.M. Chung, 1987. Embryological studies on somite formation of early amphibian embryo. *Envir. Muta. and Car.* **7-1**: 17-32.
- Keller, R.E., 1976. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*.II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. *Dev. Biol.* **51**: 118-137.
- Lynch, K., 1990. Development and innervation of the abdominal muscle in embryonic *Xenopus laevis*. *Amer. J. Anatomy* **187**: 374-392.
- Mohun, T.J., S. Brennan, N. Dethan, S. Fairman, and J. B. Gurdon, 1984a. Cell type specific activation of actin genes in the early amphibian embryo. *Nature* **311**: 716-721.
- Mohun, T.J., S. Brennan, and J.B. Gurdon, 1984b. Region specific regulation of actin multi-gene family in early amphibian embryos. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B 307**: 337-342.
- Nieuwkoop, P.D. and J. Faber, 1967. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). *North Holland Publ. Co., Amsterdam*.
- Pearson, M. and T. Elsdale, 1979. Somitogenesis in amphibian embryos. I. Experimental evidence for an interaction between two temporal factors in the specification of somite pattern. *J. embryol. Exp. Morph.* **51**: 27-50.
- Ruiz i Altaba, A. and T.M. Jessel, 1991. Retinoic acid modifies pattern of cell differentiation in the central nervous system of neurula stage *Xenopus* embryos. *Development* **112**: 945-958.
- Sharpe, C.R., 1992. Retinoic acid and the late phase of neural induction. *Development*. 203-207.
- Sive H.L., K. Hattori, R.M. Harland, H. Weintraub, 1990. Identification of a retinoic acid sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **4**: 932-942.
- Thaller, C., and G. Eichele, 1987. A non-radioactive *in situ* hybridisation method for the localisation of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**: 81-85.
- Tickle, C., B. Alberts, L. Wolpert, and J. Lee, 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* **296**: 564-565.
- Youn, B.W. and G.M. Malacinski, 1981. Comparative analysis of amphibian somite morphogenesis: Cell rearrangement patterns during rosette formation and myoblast fusion. *J. embryol. Exp. Morphol.* **66**: 113-150.

(Accepted September 10, 1994)

The effect of Retinoic Acid on the Pattern Formation of Somite in *Xenopus laevis*.

Won-Sook Kim and Hae-Moon Chung (Department of Biology Education, College of Education, Seoul National University)

It was revealed that the retinoic acid (RA) treatment affected on the central nervous system as well somite segmentation in early *Xenopus laevis* embryos. If *Xenopus* embryos were treated with RA at early gastrula stage, somites has rod-shaped arrangement (||||) contrast to arrowhead pattern (<<<<<) in control group. Its effect on the degree of rod-shaped arrangement was also dose-dependant. When the embryos were treated at neurula stage somite showed blurred pattern. The position of the blurred area is related with treated stage, thus more posterior region was affected by later treatment. However the blurred position is independent of the RA concentration. Previous studies revealed that the blurred region by heat shock, cyclohexamide and actinomycin D was restricted to several somites. However the blurred region in the RA treated embryos is continuous from the starting point to the end of the tail. The continuous blurring pattern might be explained that RA affects some gene or genes which are expressed at gastrula and neurula stages and the abnormal expression of these genes affect the other gene or genes which regulate the pattern formation of the somite.

The expression of α -cardiac actin mRNA is repressed by RA treatment at early gastrula stage, whereas it's expression is normal in the embryos treated at neurula stage. But the expression pattern EF1- α gene is not affected by RA treatment.