

綜 說

성게의 발생과 뼈대형성의 유전학적 연구

이 윤 호*

한국해양연구원 극지연구본부

Genetic Studies on the Sea Urchin Embryogenesis and Skeletogenesis

YOUN-HO LEE*

Korea Ocean Research and Development Institute, Polar Sciences Laboratory, Ansan 425-600, Korea

바닷가에서 흔히 볼 수 있는 성게는 중요한 수산자원일 뿐만 아니라 발생학 연구가 시작된 1800년대부터 지금까지 100여 년 이상 해양생물 발생연구의 모델이 되어 왔다. 최근 성게 배아(embryo)는 환경오염이나 독성 연구의 모델로서도 자주 이용된다. 성게가 널리 연구대상이 되는 이유는, 시료 확보와 배아의 실험실 배양이 쉽고, 세포의 이동과 기관 형성 등 배아의 발달과정이 명확히 관찰되며, 배아에 대한 세포 조작과 유전자 조작이 가능하다는 실험 모델로서의 장점 때문이다. 또한, 성게가 생물계 내에서 갖는 진화적, 발생학적 중요성 역시 성게 연구를 활발하게 하는 주된 이유가 되고 있다. 성게는 전구동물에서 후구동물이 분리되어 진화한 초기 단계를 대표하는 생물군이며, 부유성섭식유생(planktotrophic larvae) 시기를 거쳐 발달하는 대다수 해양무척추동물을 대표하는 생물군이기도 하다. 성게의 수정란은 약 7시간 후 60세포기에 이르며 이후 상실기, 포배기, 낭배기를 거쳐 플루테우스(pluteus) 유생으로 발달한다. 성게의 60 세포기 배아에는 이미 서로 다른 기관으로 발달할 5개의 구역(territories; fate map)이 정해진다. 각 구역의 세포들은 구역 특유의 유전자를 발현하게 된다. 식물극(vegetal pole)에 위치한 마이크로미어(micromere) 세포군은 포배 중기에 포배강 내로 들어가 일차중배엽세포(primary mesenchyme cells, PMCs)를 형성하고 이 후 유생의 뼈대(spicule)를 만든다. PMCs에서는 뼈대형성에 관여하는 SM30, SM37, SM50, PM27, msp130 등의 유전자가 발현된다. 이들 중 SM37과 SM50은 뼈대의 열개(matrix)를 만드는 염기성 단백질로서 Glycine, Proline, Glutamine이 많은 반복구조를 갖는다. 이 두 유전자는 발현시기와 기능이 유사하여 과거 한 유전자에서 진화된 유전자군(gene family)으로 생각된다. 성게의 발생 관련 유전자의 발현과 기능에 대한 연구는 해양무척추동물의 부유성섭식유생 발생에 대한 분자수준의 이해를 가능케 하며, 연체동물의 껍질 형성, 어류의 뼈대 형성, 척추동물의 뼈대 형성 등 생물계에서 공통적으로 보이는 소위 생광물화(biomineralization)의 유전학적 기전을 이해하는데 커다란 도움이 되고 있다.

The sea urchin has been used as sea food in many countries. This species has also been an important organism of embryological studies for more than a century. In recent years, sea urchin embryos are being used as testing materials for toxicity of pollutants and toxins. Usefulness of sea urchin embryos as experimental models comes from the easiness in obtaining sea urchin samples and a lot of gametes, in rearing embryos in the laboratory, in observing the cellular movement and organ formation during the embryogenesis and in manipulating blastomeres and genetic materials. The sea urchin in itself is a key organism for the understanding of deuterostome evolution from the protostomes and of indirect development of marine invertebrates which undergo the planktotrophic larval stage. A fertilized sea urchin egg goes through rapid cleavage and becomes a 60 cell embryo 7hr after fertilization. It then develops into a morula, a blastula, a gastrula and finally a pluteus larva approximately 70 hr after fertilization. At the 60 cell stage, the embryo comprises of five territories that express territory-specific genes and later form different organs. Micromeres at the vegetal pole ingress into the blastocoel and become the primary mesenchyme cells(PMCs). PMCs express genes involved in skeletogenesis such as SM30, SM37, SM50, PM27, msp130. Among the genes, SM37 and SM50 are considered to be members of a gene family which is characterized by early blastula expression, Glycine-Proline-Glutamine rich repeat structures and spicule matrix forming basic proteins. Genetic studies on the sea urchin embryos help understand the molecular basis of indirect development of marine invertebrates and also of the biomineralization common to the animal kingdom.

*Corresponding author: ylee@kordi.re.kr

서 론

성게는 전 세계의 얇은 바다에서 흔히 볼 수 있는 해양무척추 동물이다. 밤송이처럼 가시로 덮인 성게가 얇은 바다의 바위 표면이나 틈에서 쉽게 발견된다. 성게의 생식소는 세계 여러 나라에서 식용으로 이용된다. 우리 나라에서도 성게의 생식소가 고가에 매매되고 있다. 성게 자원을 증대시키기 위한 노력으로서 국립수산진흥원은 동해안에서 매년 성게의 종묘생산과 방류사업을 벌이고 있다(이 등, 2000).

성게는 수산자원으로 중요할 뿐 아니라 학문적으로도 중요한 생물군이다. 발생학이 시작된 1800년대부터 성게가 발생학 연구의 주 모델이 되어왔다. 성게 발생에 대한 연구는 1847년(Dufosse in Monroy, 1986)까지 거슬러 올라간다. 그 후, Hertwig(1876), Fol(1877), Bovery(1888), Driesch(1892) 등으로 이어지면서 수정과 발생에 대한 연구가 성게를 중심으로 이루어졌다. 성게가 발생학 발달 초기에 연구의 중심에 서게 된 이유는 다른 어떤 연구재료의 획득이 용이하기 때문이었다(Monroy, 1986). 성게는 적도에서 극지방에 이르기까지 전세계 어느 바다에나 서식하며 바닷가에서 쉽게 발견된다. 성게는 산란기가 길며, 간단한 염화칼륨(KCl, 0.5N) 처리로 암수판몸의 개체에서 다량의 난자와 정자를 채집할 수 있다. 실험실에서 수정란을 배양하기가 쉬우며 배아(embryo)가 투명하여 발생과정을 관찰하기가 용이하다는 장점도 갖고 있다. 또한, 발생 중인 성게의 배아에 인위적인 조작(특정 세포의 제거나 그 위치 변경)을 가할 수 있으며, 인공유전자를 넣어 줄 수도 있다. 이와 같은 장점들이 분자발생학이 주류를 이루고 있는 지금도 발생 초기의 유전자 발현조절을 연구하는데 성게가 모델 생물로서 자주 쓰이고 있는 이유이다(Davidson et al., 1998).

한편, 성게는 진화적 관점에서 볼 때 전구동물(protostomia)에서 후구동물(deuterostomia)이 분리되는 중간 단계에 위치하는 생물군으로 후구동물 진화를 이해하는 열쇠가 된다. 인간을 포함하는 척추동물이 모두 후구동물에 속한다. 또한, 성게는 부유성섭식 유생(planktotrophic larvae) 단계를 거쳐 발생하는 대다수 해양무

척추동물을 연구하는데 기초 모델이 되고 있다(Peterson et al., 1997).

본 논문은 성게 발생 연구의 중요성과 성게 발생의 일반적 과정을 살펴보고, 성게에서 특별히 연구가 많이 되고 있는 뼈대형성 과정의 유전학 연구를 정리해 보고자 한다.

성게 발생 연구의 중요성

삼배엽성 동물(triloblasts)은 크게 전구동물(protostomia)과 후구동물(dueterostomia)로 나뉜다(Hyman, 1940; Aguinaldo et al., 1997; Fig. 1). 곤충과 새우, 갯지렁이, 조개 등 대부분의 무척추동물이 전구동물에 속하며 성게, 미더덕 등과 어류, 양서류, 파충류, 조류, 포유류 등 척추동물이 모두 후구동물에 속한다. 성게가 속하는 극피동물(Echinoderm)은 Fig. 1에서 보듯이 후구동물 진화의 초기에 분화된 생물군이다. 성게는 후구동물이지만 전구동물과 공통된 특징을 갖기도 한다. 대부분의 전구동물처럼 성게는 생체 구조의 측면에서 성체와 전혀 다른 부유성유생 단계를 거쳐 발생한다(간접발생: indirect development). 따라서, 척추동물 진화의 근본 뿌리를 이해하기 위해서 전구동물과 후구동물 사이의 접이치대에 위치한 성게를 연구하는 것이 매우 중요하다. “개체발생은 계통발생을 반복한다”는 Haeckel의 단언이 전적으로 옳지만은 않더라도(Haeckel in Gould, 1977), 생물 진화의 기록을 뿌리 생물군의 발생과정에서 드러나는 공통된 형질(sympleiomorphy)에서 찾을 수 있기 때문에 성게의 발생에 대한 연구가 후구동물 전체의 진화과정을 이해하는 바탕이 될 것으로 생각되고 있다.

해양의 많은 무척추동물이 위에서 언급한 간접발생을 거친다. 수정란이 난황을 거쳐 부유성섭식유생(planktotrophic larva)으로 발달하고, 이 유생이 일정기간 해수 중에서 플랑크톤을 먹으며 떠돌다가 변태하여 성체가 된다(Peterson et al., 1997). 유생은 그 형태와 구조에서 성체와 전혀 다른 특징을 갖는다. 유생의 표피가 단 하나의 세포층으로 구성되어 있으며, 한 두 개의 섬모환이 유생의 몸체를 두르고 있다(Fig. 2). 대다수 성게 종들 역시 간접발생을 따른다. 성게의 발생에 대한 연구는 해양 무척추동물의 발생

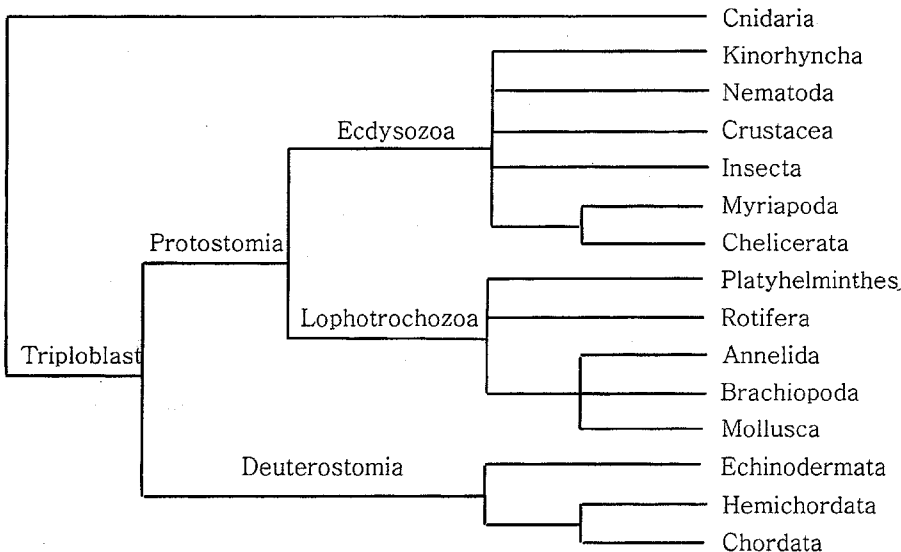


Fig. 1. A phylogeny of Triploblasts inferred from 18S rDNA. The Triploblast consists of two major groups: Protostomia and Deuterostomia, and then the Protostomia consists of Lophotrochozoa and Ecdysozoa (modified from Aguinaldo et al., 1997).

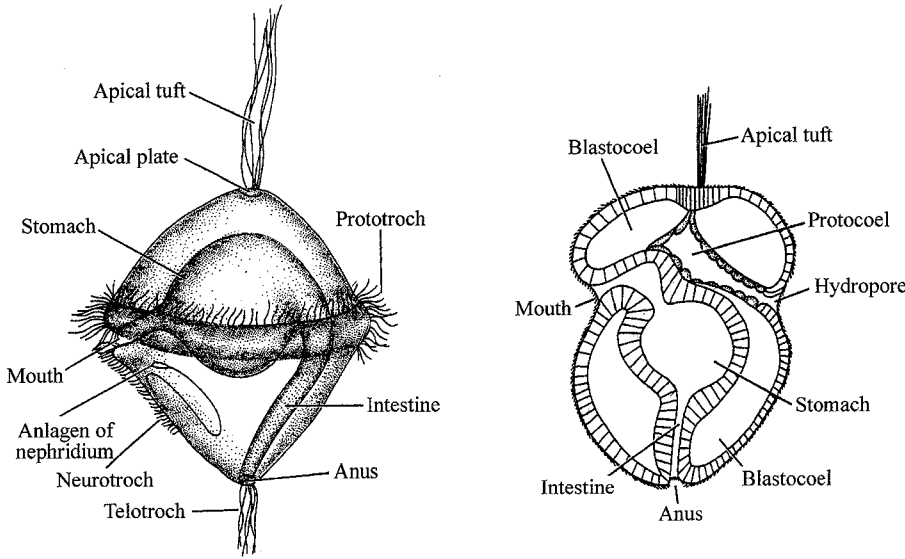


Fig. 2. Planktotrophic larvae of marine animals. Left, an early trochophore larva of a polychaete; right, a tornaria larva of an enteropneust (section) (from Brusca and Brusca, 1990).

과정을 이해하는 데 학문적 기초를 제공하고 있다.

성계의 배아는 생광물화(biomineralization)를 통하여 뼈대를 만든다. 생광물화는 생물계에서 광범위하게 관찰되는 현상으로 식물 플랑크톤의 껍질, 해파리의 균형사(statolith), 연체동물의 껍질, 척추동물의 뼈와 이빨 등에서 그 예를 찾을 수 있다. 성계 배아가 발생과정에서 뼈대를 형성하므로 이에 대한 연구가 생광물화의 유전학적 분석 모델이 되고 있다.

한편, 성계의 배아는 최근 환경오염이나 독성 연구의 모델로서도 자주 이용되고 있다(Dinnel *et al.*, 1989; 유, 1998). 성계의 배우체를 쉽게 얻을 수 있다는 점, 배아의 배양이 비교적 단순하다는 점, 독성의 영향을 관찰하기 쉽고 지수화할 수 있다는 점등이 독성 연구의 모델로서 성계가 갖는 장점이다. 오염물질이 성계 배우체(난자와 정자)의 수정과 배아의 발생에 미치는 영향을 배아의 형태 변화로써 지수화할 수 있어, 오염물질의 생물학적 독성을 지표로 나타낼 수 있다.

성계의 수정과 발생과정

성계는 암수딴몸의 생물로서 체외수정을 한다. 즉, 정자와 난자가 체외로 방출되어 해수에서 수정이 이루어진다. 배란을 인위적으로 유도해도 수정이 가능하다. 성계의 체강에 염화칼륨(0.5 N) 약 1 ml를 주입하면 방정과 방란이 시작된다. 산란기의 성계 체강은 생식소로 가득 차 있어 각 개체에서 수천만 개의 정자나 난자가 방출된다(Fig. 3). 방출된 정자는 난자를 향해 헤엄쳐 가 난자를 수정시킨다. 난자가 일단 수정되면, 수정란은 수정막으로 둘러싸이며 이차적인 수정이 억제된다(polyspermy block). 수정란은 수정막의 유무에 의하여 비수정란과 구분된다(Fig. 4). 이러한 특징으로 인해 성계의 수정률은 곧 지수화될 수 있다. 만일, 어떤 물질에 의해 수정률이 낮아진다면, 그 물질이 독성이 있음을 나타내며 저하된 수정률이 독성의 정도를 표시하는 지표가 된다.

성계의 수정란은 수정 후 약 1시간이 지나면 난황을 시작하고, 약 7시간 후 60세포기 배아로 발달한다. 이후 배아는 상실기

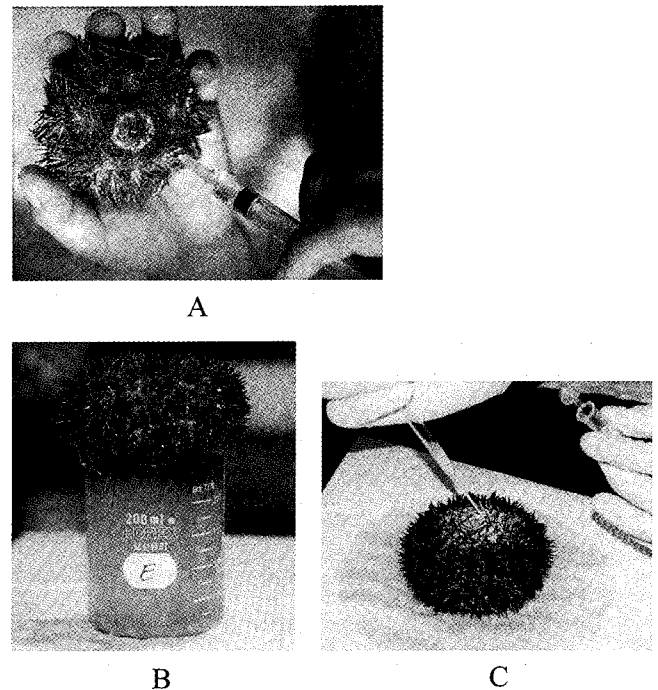


Fig. 3. Artificial induction of spawning and harvesting the gametes of the sea urchin. A, injection of 0.5N KCl into the sea urchin body cavity; B, harvesting the eggs in ice-cold sea water; C, harvesting the sperm.

(morula), 포배기(blastula), 낭배기(gastrula)를 거쳐 플루테우스(pluteus) 유생으로 발달한다(Fig. 5). 플루테우스 유생은 약 4주 동안 해수 중에서 떠돌다가 어린 개체(juvenile)로 변태하면서 연안 바닥에 착생하고 성체로 자라난다.

성계의 60 세포기 배아는 이미 발생과정의 운명이 결정된 5개의 구역(territories)으로 구성되어 있다(oral ectoderm, aboral ectoderm, vegetal plate/endoderm, skeletogenic mesoderm, small

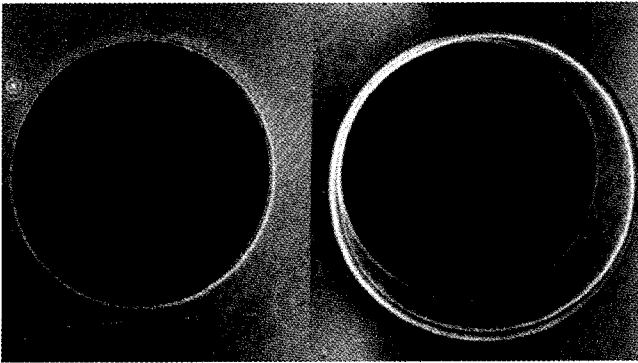


Fig. 4. Comparison of the fertilized egg (right) with the unfertilized egg (left). The fertilized egg is characterized by the fertilization envelope.

micromere; Davidson *et al.*, 1998; Fig. 5-A). 각 구역에서는 구역 특유의 유전자가 발현되면서 세포들이 서로 다른 기관(입주변의 배엽, 항문주변의배엽, 위 및 소화관, 뼈대, 중배엽세포와 체강 등)으로 발달한다. 예를 들면, CyIIIa와 같은 actin 유전자는 항문주변의 배엽에서, EctoV 유전자는 입주변의배엽에서만 발현되어 각 구역의 발달과정에 관여한다. 식물극(vegetal pole)에 가까이 위치한

skeletogenic mesoderm 구역의 마이크로미어(micromere) 세포들에서는 유생의 뼈대(spicule)를 구성하는 단백질 유전자인 SM50과 SM37 등이 발현된다. 이 세포들은 일차중배엽세포(primary mesenchyme cells, PMCs)로 발전하면서 포배기에 포배강 내로 들어가 유생의 뼈대(spicule)를 만든다(Fig. 5-A, 5-D).

16세포기의 배에서 식물극에 위치하는 마이크로미어 세포들은 독특한 특성을 갖는다. 이 세포들은 양서류의 배아(embryo)에 존재하는 spemann's organizer(Spemann and Mangold, 1924)와 같은 역할을 한다. 즉, 위와 소화관으로 구성되는 내배엽을 유도하는 능력을 보인다(Horstadius, 1935, 1939). 식물극의 마이크로미어를 떼어내어 반대 위치인 동물극에 붙여두면 동물극에서 내배엽이 형성된다(Ransick and Davidson, 1993). 마이크로미어는 성체의 배아에서 따로 떼어내 배양할 수 있는 유일한 세포이기도 하다. 앞 단락에서 언급했듯이 마이크로미어는 발생과정 후기에 포배강 내에서 유생의 뼈대를 만드는데, 따로 떼어 배양한 상태에서 생광물화(biomineralization)를 통하여 뼈대와 비슷한 골편을 만들어 낸다(Okazaki, 1975; Lee *et al.*, 1999; Fig. 6). 이와 같은 이유로 마이크로미어는 성체의 발생 연구에서 특별한 주목을 받고 있으며, 이 세포들이 발현하는 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Ettensohn *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2001).

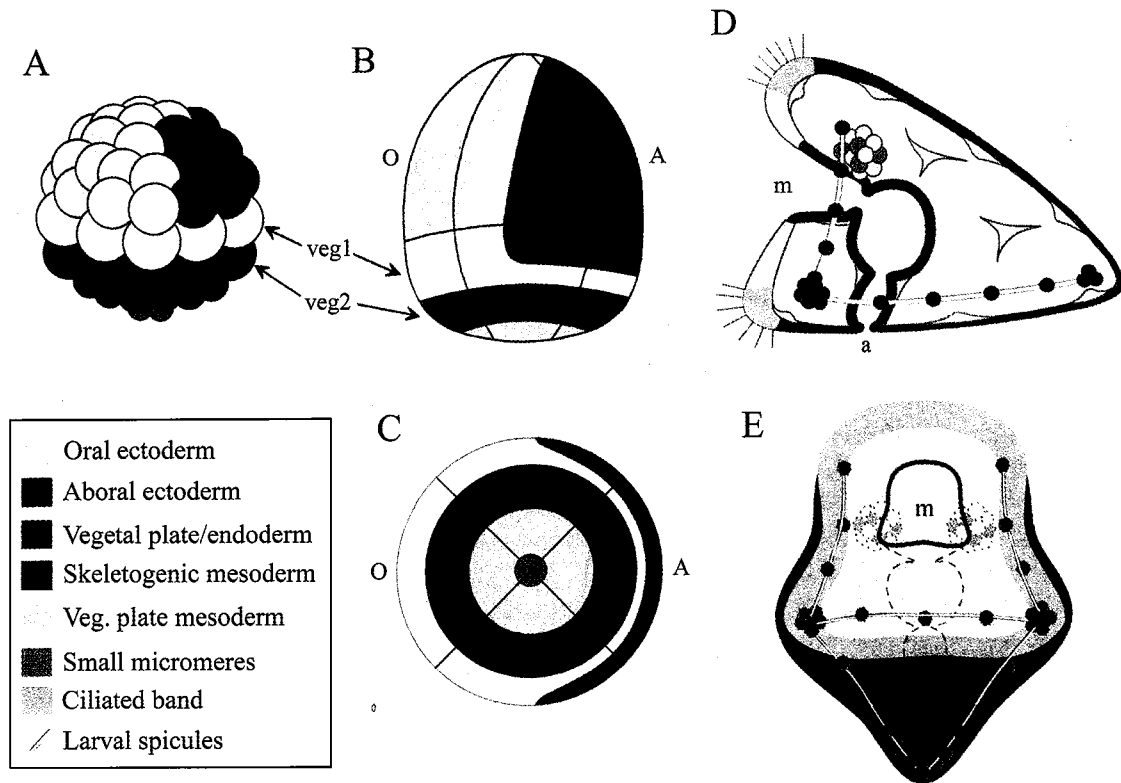


Fig. 5. Specification maps for *S. purpuratus* embryos at mid cleavage and blastula, and final disposition of cell types at the pluteus stage. (A) 60-cell stage, 6th cleavage. Eight large micromeres, descendants of the four founder cells of the skeletogenic mesenchyme are present (shown in red). (B) Mesenchyme blastula, about 500 cells, external lateral view. (C) Mesenchyme blastula, vegetal view. (D) Final state of specification in early pluteus-stage larva, about 1500 cells (65 hours postfertilisation); shown in lateral view; (E) same stage, oral ('facial') view (from Davidson *et al.*, 1998).

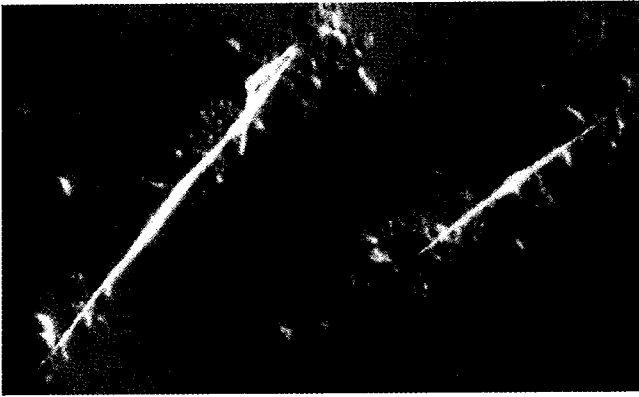


Fig. 6. Spicule formation by *in vitro* cultured micromeres. Isolated micromeres make spicule elements when they are cultured in the culture dish (from Lee *et al.*, 1999).

뼈대형성과정(skeletogenesis)

성계 유생의 뼈대는 유생의 모양을 지탱해주는 물리적인 구조물로서, 회전운동이나 진행운동에도 영향을 준다. 뼈대의 형성은 생물계에서 공통적으로 보여주는 소위 생광물화(biomineralization)에 의해 이루어진다. 성계 유생의 생광물화과정은 단백질로 구성된 유기물의 열개(matrix)가 만들어지는 단계와 여기에 탄산칼슘(CaCO_3)과 탄산마그네슘(MgCO_3) 등 광물이 집적되는 단계로 이루어진다. 이 과정을 통하여 성계 종에 따라 모양이 서로 다른 유생의 뼈대가 만들어진다(Benson *et al.*, 1986; Belcher *et al.*, 1996).

성계 유생의 뼈대를 만드는 세포는 식물극에 위치한 마이크로미어에서 유래한 일차중배엽세포(PMCs)이다. 마이크로미어는 수정후 5번째 난할에서 4개의 세포로 식물극에 나타난다. 이 후 서너 번의 세포분열을 거쳐 32~64개 세포로 증가한다(Takahashi and Okazaki, 1979). 이 세포들은 포배 중기(수정 후 약 20시간)에 포배강(blastocoel) 내로 들어가(ingression) 식물극 조금 위쪽에 고리모양으로 배열된다. 이 일차중배엽세포들은 filopodia로서 연결된 다핵세포(syncytium)를 형성한다. 특히, 복부의 양쪽 옆에 다수의 세포들이 집중되면서(ventro-lateral clusters) 이곳에서 뼈대가 형성되기 시작한다(Fig. 7). 낭배기 중기에 처음으로 만들어지는 이 뼈대는 triradiate spicule rudiment로 불린다. 이 triradiate의 각 꼭지에서 뼈대가 자라기 시작하여 한 가지는 복부 쪽으로, 다른 한 가지는 등 쪽으로, 나머지 한 가지는 분지되어 유생의 팔(arms)과 몸체(body)를 지탱하는 뼈대로 자라난다(Ettensohn *et al.*, 1997).

유생의 뼈대를 만드는 마이크로미어 세포들은 난할 중인 16세포기 혹은 32세포기 배아에서 떼어내어 배양접시에서 따로 배양하는 것이 가능하다. 이 세포들은 배양접시에서도 본래의 유전자 프로그램에 따라 뼈대(spicule)를 만든다(Okazaki, 1975; Lee *et al.*, 1999; Fig. 6). 한가지 차이점은 배양접시에서 만들어지는 뼈대가 대개 막대 모양으로서 실제 유생의 뼈대와 같은 복잡한 구조를 갖지 못한다는 점이다. 이러한 차이는 뼈대형성과정 전체가 PMC 세포 단독으로 이루어지는 것이 아니라, PMC 세포와 외배엽 표피세포 사이의 신호전달(signal transduction)과 같은 세포간의 상호작용이

유생의 뼈대 모양을 결정하는데 관여하기 때문이다(Ettensohn, 1990). 외배엽 표피세포의 신호에 따라 PMC 세포들의 포배강 내 위치가 결정되고, 이에 따라 뼈대가 자라는 방향과 뼈대의 크기 등이 결정된다.

뼈대형성 관련 유전자

성계 유생의 뼈대 형성에는 많은 유전자들이 관여하고 있다고 생각된다. 뼈대형성과 관련된 유전자들이 만드는 단백질은 기능에 따라 크게 두 종류로 나뉜다: 뼈대 자체를 구성하는 단백질과 뼈대 형성에 간접적으로 관여하는 단백질. 뼈대 자체를 구성하는 단백질은 소위 matrix protein이라 하여 탄산칼슘과 같은 광물이 집적될 수 있는 단백질의 열개를 만든다(Benson *et al.*, 1986). 결국, 뼈대의 형성은 이 단백질 열개가 짜여진 방향에 따라 진행된다. 뼈대형성에 간접적으로 관여하는 단백질은 PMCs 세포와 외배엽 세포간의 신호전달, protein matrix로 칼슘이온의 전달 등과 같은 역할을 한다.

생화학적 방법의 하나인 단백질의 이차원 전기영동 결과에 의하면 성계 유생의 뼈대를 구성하는 단백질이 적어도 50여 개에 달한다(Killian and Wilt, 1996). 그러나, 이들 중 지금까지 그 구조가 밝혀진 단백질은 SM30, SM37, SM50, PM27 등 단 네 개에 불과하다(Table 1). SM30은 산성의 단백질로서 뼈대를 구성하는 단백질 열개의 주요 구성원이다(George *et al.*, 1991). SM30의 유전자는 뼈대를 만드는 PMC 세포들이 포배강 내에서 고리모양을 형성한 후 뼈대를 만들기 바로 전부터(포배 후기) 발현되기 시작한다. 반면, SM37과 SM50, PM27 등 세 단백질의 유전자는 포배 초기 단계부터 이미 발현되기 시작한다. 또한, 이 세 단백질들은 친수성과 소수성이 교차하는 반복구조를 갖고 있다는 공통된 특징이 있다. 한편, SM37과 SM50의 유전자는 발현조절 인자나 그 구조에 있어 많은 공통점을 갖고 있어 진화적으로 연관된 유전자로 생각된다(Lee *et al.*, 1999). 다음 절에서 이에 대하여 자세히 다루려고 한다.

그 외 PMC 세포에서만 발현되는 유전자로서 msp130, MESO1, CBP180 등이 알려져 있다(Table 1). 이 유전자가 만드는 단백질들은 PMC 세포의 표면이나 세포 내에 위치하면서 칼슘이온과의 결합, 칼슘이온의 전달 등 뼈대 형성과정에 직, 간접적으로 관여하고 있을 것으로 생각된다(Leaf *et al.*, 1987).

SM37과 SM50 유전자 패밀리

SM37과 SM50은 성계 유생의 뼈대를 구성하는 단백질로서 그 유전자들이 염색체 상에 서로 연결되어(linked) 있다. SM37 유전자는 최근 SM50의 게놈 유전자를 분석하는 과정에서 새롭게 밝혀졌다(Lee *et al.*, 1999). SM37과 SM50 유전자는 염색체 상에서 약 12 kb 떨어져 있으며 유전자 전사(transcription)의 방향이 서로 반대이다. SM37 유전자의 앞쪽 promotor region에는 SM50 유전자의 시, 공간적 발현을 조절하는 인자로 알려진 element A, D, C 등이(Makabe *et al.*, 1995) 모두 존재한다. 따라서, 두 유전자가 동일한 전사인자(transcription factor)의 조절을 받을 것이며 이에 따라 그 시, 공간적 발현양상이 동일할 것으로 추측된다.

Table 1. Primary mesenchyme cell specific genes

Genes	Characteristics	Function/Expression pattern	References
SM30	Spicule matrix protein Signal sequence Proline-rich	Structural component of spicules mblastula to pluteus expression	George <i>et al.</i> , 1991 Akasaka <i>et al.</i> , 1994 Guss and Etensohn, 1997
SM37	Spicule matrix protein Signal sequence GAGAGAGGRWNPQ repeats	Structural component of spicules early blastula to pluteus expression	Lee <i>et al.</i> , 1999
SM50	Spicule matrix protein Signal sequence GRQPGMG repeats C-lectin like domain	Structural component of spicules early blastula to pluteus expression	Benson <i>et al.</i> , 1987 Sucov <i>et al.</i> , 1987 Killian and Wilt, 1989 Katoh-Fukui <i>et al.</i> , 1991
PM27	Spicule matrix protein Signal sequence, PGMG repeats C-lectin like domain	Structural component of spicules early blastula to pluteus expression	Harkey <i>et al.</i> , 1995
msp130	Cell surface protein GPI-anchored, N-glycosylated Glycine-rich domains	Facilitates calcium transport and spiculogenesis	Leaf <i>et al.</i> , 1987 Anstrom <i>et al.</i> , 1987 Farach-Carson <i>et al.</i> , 1989 Parr <i>et al.</i> , 1990
MESO1	380 kD cell surface glycoprotein	Unknown	Wessel and McClay, 1985
CBP180	180 kD protein	Calcium-binding protein	Iwata and Nakano, 1986

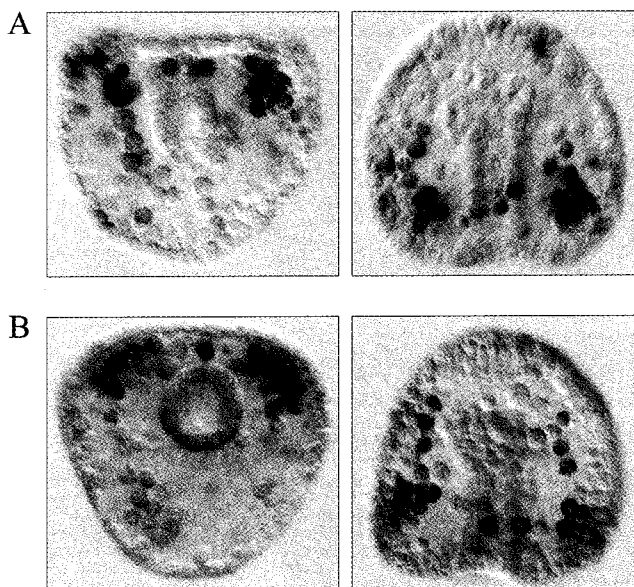


Fig. 7. Whole-mount *in situ* hybridization of SM37 (A) and SM50 (B). Embryos are about 48h old. The left panels show views from the anal plate, with the blastopore clearly evident, and the right panels views from the oral sides. All stained cells in both (A) and (B) are skeletogenic mesenchyme cells. Cells at ventro-lateral clusters are most heavily stained (from Lee *et al.*, 1999).

실제로 SM37과 SM50 유전자는 성체 배아의 발달과정에서 거의 동일한 시, 공간적 발현패턴을 보여 준다(Fig. 7, 8). 배아에서 유전자가 발현되는 특정 세포와 기관을 파악하는 방법인 whole-mount *in situ* hybridization 기술로 위 두 유전자의 발현 패턴을 조사해 본 결과, 두 유전자의 공간적 발현패턴이 일치하였다: 두 유전자 모두 포배강(blastocoel) 내에 고리모양으로 배열된 일차중

배엽세포(PMCs)에서 발현되었다(Fig. 7). 특히, 뼈대가 만들어지기 시작하는 ventro-lateral cluster의 세포들에 그 발현이 집중되었다. 뼈대를 만드는 세포들을 배아에서 떼어 내어 배양접시에서 배양할 때에도 이 세포들(skeletogenic mesenchyme)에서 SM37과 SM50 유전자가 모두 발현되었다(Lee *et al.*, 1999). SM37과 SM50 유전자의 시간적 발현패턴 역시 거의 동일하였다. 두 유전자의 발현은 수정 후 약 15시간이 지난 포배 초기에 시작되어 뼈대의 형성이 가장 활발히 일어나는 낭배 후기에 최고조에 달하고 이후 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 8). 이와 같이 SM37과 SM50의 시, 공간적 발현양상이 동일한 것은 뼈대 형성 시 두 유전자가 만드는 단백질의 기능이 상호 밀접한 연관성을 갖고 있음을 시사한다.

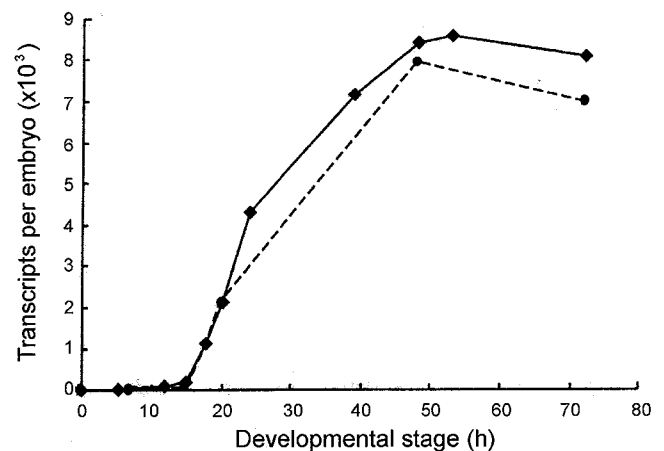


Fig. 8. Developmental changes in SM37 (●) and SM50 (◆) transcripts per embryo. Transcripts were measured by single-strand probe excess titration in embryo RNA of the indicated stage. SM50 and SM37 transcripts accumulate with very similar kinetics (from Lee *et al.*, 1999).

	1					50
SM37	MESTLRFACL	LAGLIAVQAQ	CPPSWVKVEN	-- SCYRAFGQ	LKTYDMASQS	
SM50	MKGVLFIIVAS	LI-AFATGQD	CPAYYVRSQS	GQSCYRYFNM	RVPYRMASEF	
	51					100
SM37	CKTFTGCDGI	SPGHLAAPT	FEERRAVRKI	RFDLLRPIGG	NRIGEGQRLR	
SM50	CEMVTPC-GN	GPAKMGALAS	VSSP----	QENMEIYQLVAG	FSQ-DNQ--M	
	101					150
SM37	PSNVWMGFRL	GQGANSSWDS	TEQYDNLLLD	QHWGPN---R	PNMPPGQR---	
SM50	ENEVWLGWNS	-QSPFFWEDG	TPAYPNGFAA	FSSSPASPPR	PGMPPTRSWP	
	151					200
SM37	-- PQAQAFDP	TNFRWNGRCM	---TLPGQMQ	MNGAVQ---K	WGHI-ACNMQ	
SM50	VNPQNPMSPG	PGRAPVMKRQ	NPPVPRGQGG	RQIPQGVGPQ	WEAVEVTAMR	
	201					250
SM37	AAYMCEISPA	GTVNPNTG	GGQGGFNSST	GMGPMPGGG	RGGWGQGGQ-	
SM50	A-FVCEV-PA	GRNIPI----	GQQPGMG-QG	GFGNQQPGMG	GRQPGFGNQP	
	251					300
SM37	-GQGGQGGRG	GWGAGAGTGQ	GAG--GGWGG	QNPQNPAGG	GRWNPN----	
SM50	GMGGRQPGFG	NQPGMGGRQP	GWGNQPGVGG	RQPGMGGQQP	GWGNQPGVGG	
	301					350
SM37	QGAGAGAGA-	-GGRWNP-	-----	-----QG	AGAGAGAGGR	
SM50	RQPGMGGQPG	VGGRQPGFGN	QPGMVDNNQA	WTTTTRLGNQ	PGVGGRRQPGM	
	351					400
SM37	WNPQAGAGAG	AGAGGRWNP	QGAGAGGAGA	GGWNPQAG	AGRWNP----	
SM50	GGQPGVGGRRQ	PGVGGRRQ-PG	FGNQPGVGGR	QPGMGGQQP	MGGQPGVGGR	
	401					450
SM37	-----	-----QTPQ	NPGQGGRW--	-----	---NPQNP--	
SM50	QPGMGGRRQP	FGNQPGVGGR	QPGMGGQQP	NPNNPNPNP	NNPNPNPRF	
	451					465
SM37	SRPRMYQQGQ	ALAMP				
SM50	NRPRMLQEAD	ALA--				

Fig. 9. Sequence alignment of SM37 and SM50 proteins. Conserved amino acids are marked in bold (modified from Lee et al., 1999).

SM37과 SM50은 단백질의 구조에서도 공통된 특징을 보인다. 이 두 단백질은 분자의 후반부에 친수성과 소수성이 교차되어 나타나는 반복구조를 갖는다. 각 반복 단위는 주로 Glycine(G), Proline(P), Glutamine(Q)으로 이루어져 있다(Fig. 9). 이와 같은 독특한 반복구조는 성계의 뼈대 단백질뿐만 아니라 전복의 껍질을 구성하는 단백질, 척추동물의 이빨을 구성하는 단백질, 거미줄을 구성하는 단백질 등 생광물화와 연관되거나 높은 인장강도가 요구되는 단백질에서 흔히 발견되고 있다(Shen et al., 1997; Smith et al., 1999). 이러한 단백질들에서 반복구조는 단백질과 단백질, 단백질과 탄수화물, 단백질과 이온 사이의 상호 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. SM37과 SM50의 반복구조는 성계 유생의 뼈대형성 과정에서 단백질과 단백질의 상호결합에 의해 열개(protein matrix)가 형성되고 열개 단백질과 탄산칼슘의 상호작용에 의해 광물이 일정한 배열로 집적되는 데 필요할 것으로 추측된다. SM37과 SM50 단백질은 G, P, Q의 반복구조 이외에 단백질의 앞부분(N-terminal)과 뒷부분(C-terminal)에 동일한 아미노산 배열을 갖고 있어 서로 구조적 유사성이 높다(N-terminal: SCYRXF, C-terminal: RPRMXQ, Fig. 9). 전체적으로 SM37 단백질은 SM50 단백질과 아미노산 배열에서 약 30% 일치한다.

한편, 성계 유생의 뼈대를 구성하는 또 다른 단백질인 SM30은 위와 같은 반복구조를 갖지 않는 산성의 단백질로서 염기성의 SM37이나 SM50과 성격이 전혀 다르다. 유전자간 유사도에 있어

서도 SM30은 위 두 유전자와 비교할 때 매우 낮은 수치를 보인다(25% 이하). 따라서, 성계 유생의 뼈대 형성에는 서로 성격이 다른 여러 단백질들이 관여하고 있을 것으로 생각된다.

SM37과 SM50 단백질들이 구조와 기능에서 높은 유사성을 보이고, 시, 공간적인 발현양상이 비슷한 것은 두 유전자가 공통의 조상 유전자(common ancestor gene)에서 유래한 하나의 유전자군(gene family)임을 시사한다. 즉, 생광물화에 관여하던 한 유전자가 복제되고(gene duplication) 분화되면서(diversification) 현재와 같은 두 유전자로 발전하였을 가능성이 있다. 생광물화는 생물진화와 함께 뼈대의 구조가 복잡해지고 다양해지면서 보다 많은 유전자의 작용이 필요해졌을 것이다. 하나의 유전자에서 분화된 SM37과 SM50은 상호 보완적인 역할을 하며 그 반복 구조를 활용하여 성계 유생의 뼈대를 구성하는 단백질 열개(protein matrix)를 만드는 데 관여할 것이다. 우리는 이제 성계 유생의 뼈대형성에 관여하는 한 유전자군을 발견함으로써 앞으로 이와 유사한 유전자를 더욱 쉽게 발견할 수 있을 것이며, 이 유전자군의 발현조절과 기능에 대한 연구를 통하여 성계의 발생과 뼈대형성과정에 대한 유전학적 이해를 넓힐 수 있을 것이다.

결론

바닷가에서 흔히 볼 수 있는 해양무척추동물인 성계는 100여 년 이상 발생학 연구의 대상이 되어 왔으며, 최근에는 환경오염이

나 독성 연구의 모델로서 그리고 생물계의 다양한 생물군에서 공통적으로 보여지는 생광물화(biomineralization)의 연구대상으로 이용되고 있다. 성계가 널리 연구대상이 되는 이유는 시료의 확보와 배아의 실험실 배양이 쉽고 배아 발생 과정에 대한 관찰과 인위적 조작이 용이하다는 실험모델로서의 장점을 갖고 있기 때문이다. 또한, 성계가 전구동물에서 후구동물이 분리되어 진화한 초기 단계를 대표하는 생물군이며 부유성섭식유생(planktotrophic larvae) 시기를 거쳐 발달하는 대다수 해양무척추동물을 대표하는 생물군이라는 진화적, 발생학적 중요성 역시 성계 연구를 활발하게 하는 주된 요인이다. 수정란이 상실기, 포배기, 낭배기로 발달하고 플루테우스(pluteus) 유생 단계를 거쳐 어린 개체로 변태하는 성계의 발달 과정은 대다수 해양무척추동물이 보이는 간접발생(indirect development)의 전형적인 모델이 되었다. 최근, 유전학의 진보와 함께 성계의 발생 관련 유전자에 대한 분석이 활발히 진행되며, 각 배아 세포들이 어떤 유전자를 발현하여 어떤 기관을 형성하는가가 분석되고 있다. 특히, 내배엽을 유도하며 유생의 뼈대를 만드는 마이크로미어(micromere) 세포군에 대해 연구가 집중되고 있다. 이 세포군이 발현한 일차중배엽세포에서 뼈대의 열개(protein matrix)를 구성하는 유전자가 발견되기도 하였다. 성계 배아의 발생 관련 유전자 연구는 대다수 해양무척추동물의 간접발생에 대한 분자수준의 이해를 가능케 하며, 후구동물 진화와 생광물화(biomineralization) 과정에 대한 유전학적 이해를 증진시키고 있다.

사 사

본 연구는 한국해양연구원 기관고유사업(PE98745)과 과학기술부 국가지정연구실 사업(2000-N-NL-01-C16)의 연구비 지원을 받아 수행되었다. 본 논문을 정성껏 심사해 주신 두 분 심사위원께 감사드립니다.

참고문헌

- 이채성, 이정용, 김광기, 김기승, 김두호, 박세규, 2000. 유용양식 종의 종묘생산 기술개발 및 종보존. I. 종묘생산 보급. 국립수산진흥원 동해수산연구소 사업보고서, **2000**: 243-252.
- 유춘만, 1998. 성계 알을 이용한 생물검정에 의한 연안해수 수질 평가에 관한 연구. 한국해양학회지-바다, **3**: 170-174.
- Aguinaldo, A.M., J.M. Turbeville, L.S. Linford, M.C. Rivera, J.R. Garey, R.A. Raff and J.A. Lake, 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, **387**: 489-492.
- Akasaka, K., T.N. Frudakis, C.E. Killian, N.C. George, K. Yamasu, O. Khaner and F. Wilt, 1994. Genomic organization of a gene encoding the spicule matrix protein SM30 in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.*, **269**: 20592-20598.
- Anstrom, J.A., J.E. Chin, D.S. Leaf, A.L. Parks and R.A. Raff, 1987. Localization and expression of msp130, a primary mesenchyme lineage-specific cell surface protein of the sea urchin embryo. *Development*, **101**: 255-265.
- Belcher, A.M., X.H. Wu, R.J. Christensen, P.K. Hansma, G.D. Stucky and D.E. Morse, 1996. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature*, **381**: 56-58.
- Benson, S.C., N.C. Benson and F. Wilt, 1986. The organic matrix of the skeletal spicule of sea urchin embryos. *J. Cell. Biol.*, **102**: 1878-1886.
- Benson, S.C., H.M. Sucov, L. Stephens, E.H. Davidson and F. Wilt, 1987. A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. I. Authentication of the cloned gene and its developmental expression. *Dev. Biol.*, **120**: 499-506.
- Boveri, T.H., 1888. Ueber den Antheil des Spermatozoon an der Theilung des Eies. *Sber. Ges. Morph. Physiol. Munchen.*, **4**: 151-164.
- Brusca, R.C. and G.J. Brusca, 1990. Invertebrates. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Davidson, E.H., R.A. Cameron and A. Ransick, 1998. Specification of cell fate in the sea urchin embryo: Summary and some proposed mechanisms. *Development*, **125**: 3269-3290.
- Dinnel, P.A., J.M. Link, Q.J. Stober, M.W. Letourneau and W.E. Roberts, 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**: 748-755.
- Driesch, H., 1892. The potency of the first two cleavage cells in echinoderm development. Experimental production of partial and double formations. In B.H. Willier and J.M. Oppenheimer (eds.), *Foundations of Experimental Embryology*. Hafner, New York.
- Ettensohn, C.A., 1990. The regulation of primary mesenchyme cell patterning. *Dev. Biol.*, **140**: 261-271.
- Ettensohn, C.A., K.A. Guss, P.G. Hodor and K.M. Malinda, 1997. The morphogenesis of the skeletal system of the sea urchin embryo. *Reproduc. Biol. of Inv.*, Vol. VII (J. R. Collier, ed.): 225-265.
- Farach-Carson, M.C., D.D. Carson, J.J. Collier, W.J. Lennarz, H.R. Park and G.C. Wright, 1989. A calcium-binding, asparagine linked oligosaccharide is involved in skeleton formation in the sea urchin embryo. *J. Cell. Biol.*, **109**: 1289-1299.
- Fol, M.H., 1877. Sur le premier développement d'une Etoile de mer. *Comptes Rendus.*, **84**: 357-360.
- George, N.C., C.E. Killian and F.H. Wilt, 1991. Characterization and expression of a gene encoding a 30.6KD *Strongylocentrotus purpuratus* spicule matrix protein. *Dev. Biol.*, **147**: 334-342.
- Gould, S.J., 1977. Ontogeny and phylogeny. Belknap press, Cambridge, MA, USA.
- Guss, K.A. and C.A. Ettensohn, 1997. Skeletal morphogenesis in the sea urchin embryo: Regulation of primary mesenchyme gene expression and skeletal rod growth by ectoderm-derived cues. *Development*, **124**: 1899-1908.
- Harkey, M.A., K. Klueg, P. Sheppard and R.A. Raff, 1995. Structure, expression, and extracellular targeting of PM27, a skeletal protein associated specifically with growth of the sea urchin larval spicule. *Dev. Biol.*, **168**: 549-566.
- Hertwig, O., 1876. Beitrage zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *Morph. j.*, **1**: 347-432.
- Horstadius, S., 1935. Uber die Determination im Verlaufe der Eiasche bei Seeigeln. *Pubbl. Stn. Zool. Napoli.*, **14**: 251-479.
- Horstadius, S., 1939. The mechanics of sea urchin development studied by operative methods. *Biol. Rev.*, **14**: 132-179.
- Hyman, L.H. 1940. The invertebrates. McGraw-Hill, New York.

- Iwata, M. and E. Nakano, 1986. A large calcium-binding protein associated with the larva spicule of the sea urchin embryo. *Cell Diff.*, **19**: 229–236.
- Katoh-Fukuki, Y., T. Noce, T. Ueda, Y. Fujiwara, N. Hashimoto, T. Higahinakagawa, C.E. Killian, B.T. Livingston, F.H. Wilt, S.C. Benson, H.M. Sucov and E.H. Davidson, 1991. The corrected structure of the SM50 spicule matrix of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.*, **145**: 201–202.
- Killian, C.E. and F.H. Wilt, 1989. The accumulation and translation of spicule matrix protein mRNA during sea urchin embryo development. *Dev. Biol.*, **133**: 1481–1456.
- Killian, C.E. and F.H. Wilt, 1996. Characterization of the proteins comprising the integral matrix of *Strongylocentrotus purpuratus* embryonic spicule. *J. Biol. Chem.*, **271**: 9150–9159.
- Leaf, D.S., J.A. Anstrom, J.E. Chin, M.A. Harkey, R.M. Showman and R.A. Raff, 1987. Antibodies to a fusion protein identify a cDNA clone encoding msp130, a primary mesenchyme-specific cell surface protein of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.*, **121**: 29–40.
- Lee, Y.H., R.J. Britten and E.H. Davidson, 1999. SM37, a skeletogenic gene of the sea urchin embryo linked to the SM50 gene. *Dev. Growth Differ.*, **41**: 303–312.
- Makabe, K.W., C.V. Kirchhamer, R.J. Britten and E.H. Davidson, 1995. Cis-regulatory control of the SM50 gene, an early marker of skeletogenic lineage specification in the sea urchin embryo. *Development*, **121**: 1957–1970.
- Monroy, A., 1986. A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *Biol. Bull.*, **171**: 509–519.
- Okazaki, K., 1975. Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. *Am. Zool.*, **15**: 567–581.
- Parr, B.A., A.L. Park and R.A. Raff, 1990. Promoter structure and protein sequence of msp130, a lipid-anchored sea urchin glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **265**: 1408–1413.
- Peterson, K.J., R.A. Cameron and E.H. Davidson, 1997. Set-aside cells in maximal indirect development: Evolutionary and developmental significance. *BioEssays.*, **19**: 623–631.
- Ransick, A. and E.H. Davidson, 1993. A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo. *Science*, **259**: 1134–1138.
- Shen, X., A.M. Belcher, P.K. Hansma, G.D. Stucky and D.E. Morse, 1997. Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 32472–32481.
- Smith, B.L., T.E. Schaffer, M. Viani, J.B. Thompson, N.A. Frederick, J. Kindt, A. Belcher, G.D. Stucky, D.E. Morse and P.K. Hansma, 1999. Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites. *Nature*, **399**: 761–763.
- Spemann, H. and H. Mangold, 1924. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. In B.H. Willier and J.M. Oppenheimer (eds.), *Foundations of Experimental Embryology*. Hafner, New York, 144–184.
- Sucov, H.M., S. Benson, J.J. Robinson, R.J. Britten, F. Wilt and E.H. Davidson, 1987. A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. II. Structure of the gene and derived sequence of the protein. *Dev. Biol.*, **120**: 507–519.
- Takahashi, M.M. and K. Okazaki. 1979. Total cell number and number of the primary mesenchyme cell in whole, 1/2 and 1/4 larvae of *Clypeaster japonicus*. *Dev. Growth Differ.*, **21**: 553–566.
- Wessel, G.M. and D.R. McClay. 1985. Sequential expression of germ-layer specific molecules in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.*, **111**: 451–463.
- Zhu, X., G. Mahairas, M.I. Iliis, R.A. Cameron, E.H. Davidson and C.A. Etensohn, 2001. A large-scale analysis of mRNAs expressed by primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo. *Development*, **128**: 2615–2627.

2001년 10월 16일 원고접수

2001년 11월 10일 수정본 채택

담당편집위원: 이상훈