

개불 (*Urechis unicinctus*) Sperm Ball과 정자의 미세구조와 금 입자 면역 반응에 의한 α -Tubulin의 분포

신 길 상

순천향대학교 자연과학 대학 생명과학부

The Fine Structure of the Sperm Ball and Sperm of *Urechis unicinctus* and Immunogold Localization of α -Tubulin

Kil-Sang Shin

Department of Life Science, College of Natural Science,
Soonchunhyang University, Chungnam, Asan, 337-745, Korea

(Received March 3, 1998)

ABSTRACT

The *Urechis unicinctus* sperm and spermatogenic cells prepared from the testis are investigated to identify α -tubulin of axoneme microtubules using mouse monoclonal anti- α -tubulin as the first Ab and Gold(10nm) conjugated goat anti-mouse IgG as the Ab marker. The Ag-Ab reaction analyzed excellently the localization of α -tubulin and the gold particles incorporated with the proximal and distal centrioles, manchette microtubules, and flagellum. The gold particles can be also observed in the spermatogenic cells while the cells are still in sperm ball which is composed of a somatic cell and spermatogenic cells. The sperm ball is the functional unit of sperm production in *U. unicinctus* testis. The spermatids are developed from the spermatogenic cells in the sperm ball and released into the testis cavity through a cortical cytoplasmic opening.

The spermatid architectures are similar with the mature sperm of the testis cavity in aspects of shape of discoid acrosome, degree of nuclear condensation and ring type of mitochondrion. However, the distal centriole connecting with the flagella can be observed from the mature sperm while the both proximal and distal centrioles reveal only in the spermatids. The proximal centriole is directly connected with nuclear outer membrane during the stage of nuclear condensation and oriented perpendicularly to the distal centriole whose axis coinciding with the longitudinal axis of the spermatozoon. There are indications that the distal centriole is intimately associated with the polymerization of the flagellum. The manchette microtubules appear during spermatid development but the mature sperm have round head and no conspicuous middle piece.

Key words : α -tubulin, anti- α -tubulin, microtubule, sperm, sperm ball

서 론

단세포 생물로부터 고등 척추동물에 이르는 많은 동, 식물에서 미세소관 또는 axoneme은 거대 분자와 이온 등의 이동과 수송 또는 운동을 담당하는 세포 내부 기구와 섬모 및 편모를 형성하며 그 예로는 섬모충류의 운동기관(Akowska *et al.*, 1982; Hannes and Foissner, 1992), 여과 섭취 동물(filter feeder)의 구기(口器)(Bradbury and Olive, 1980; Hofmann-Muenz, 1991) 및 일부 장기(腸器) (Shin and Lee, 1997), 고등 포유류에서 기관(氣管) 등의 섬모와 세포 골격 및 동물 정자의 운동성 편모 등을 들 수 있다. 이들을 구성하는 미세소관은 모두 분자 집단의 정도에 차이가 있을 뿐 기본 구조와 분자 구성은 α -, β -튜블린(tubulin)이 주성분으로 유사하며(Wehland *et al.*, 1983; Raff *et al.*, 1997) 특히 운동성 정자 편모의 미세소관(Warner and Satir, 1974)을 구성하는 튜블린(Gibbon, 1983; Philips, 1983)과 dynein 계(Ogawa *et al.*, 1977) 물질은 매우 유사하다고 알려졌다. 이는 진화의 관점에서 α -, β -튜블린 분자의 보수성을 의미한다(Hiller, 1993; LeDizet and G. Piperno, 1987). 개불에서 정자의 편모는 그 성분이 밝혀진 성계 및 일부 고등 동물의 정자와 구조적으로 유사하다는 사실에 기인하여 α -, β -튜블린으로 구성된다는 것이 인정되고 있으나 이를 증명한 문헌은 찾아 볼수 없었다. 이러한 배경에서 본 실험에서는 생쥐의 항- α -튜블린이 해변 동물인 개불 정자 편모의 α -튜블린에 항원-항체 반응성이 있는가를 관찰하고 포유동물과 해변 동물 물질 사이에 유사성이 있는가를 관찰하고자 하였다. 본 연구의 결과는 생쥐 항- α -튜블린과 개불 정자 편모 α -튜블린 사이에 항원-항체 반응성이 있었고 이는 개불 정자 편모에 α -튜블린이 존재한다는 것과 α -튜블린의 진화적 보수성을 의미하는 것으로 생각되었다.

이 과정에서 개불의 웅성 생식세포들은 일정한 분화 단계까지 단일 체세포와 sperm ball을 형성하고 이 sperm ball속에서 발생한다는 것과 중심소체, manchette 및 편모 등 일련의 미세소관 관련 구조의 변화를 관찰할 수 있었으며 sperm ball은 웅성 생식세포

들과 일종의 부속세포라고 생각되는 단일 체세포로 구성되는 것을 볼수 있었다. 고등 동물의 정자는 부속세포인 체세포와 구조적으로 밀접한 관계를 유지하면서 발생하고 체세포인 부속세포 자체는 치밀 조직을 형성하며 편모는 유사한 시기에 중심소체로부터 생성되는 것이 알려진 예이다. 개불 정자 편모 미세소관의 생성이 체세포와 구조적으로 연관된 시기에 단부 중심소체(distal centriole)와 깊이 관계된 것은 다른 동물의 예와 유사한 것이나 이 체세포는 치밀 조직을 형성하지 않는 단일 세포이고 그 내부에 여러 발생 단계의 웅성 생식세포를 포함하여 sperm ball을 형성하는 것은 상이한 것이고 보고된 예도 드물다. 개불에서 sperm ball은 정자의 생성 단위이고 정자는 이로부터 분리된 후 정소강(testis cavity)에서 최종 분화 단계를 거치는 것으로 보이는데 정자의 성숙도에 따라 항- α -튜블린에 대한 반응과 금 입자의 분포상이 상이하였다.

한편, 개불의 여러 내부 기관들은 계절에 따른 구조 변화가 심하여 지금까지 정소의 존재가 알려진 바 없었으며 자웅 생식세포는 어떤 체강 세포로부터 발생하고 "저장낭(storage sac)"에 저장된다고 추측되었을 뿐이다(Gould-Somero, 1975). 그러나 지금까지 저장낭이라고 알려진 기관에서 본 연구의 결과 sperm ball의 존재가 확인되고 그 구조를 밝힐 수 있으므로 저장낭은 단순히 생성된 정자를 저장할 뿐 아니라 정자 생성 기관, 즉 정소인 것을 밝힐 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 개불에서 지금까지 문헌상 찾아 볼수 없는 정소의 존재와 웅성 생식세포 발생과 분화의 단위인 sperm ball의 구조, sperm ball 내에서의 정자 형성 과정과 그 특성 그리고 성숙 정자의 미세구조에 관해 연구된 결과를 보고하고자 한다. 이는 Echiuroid의 정자 편모 axoneme을 구성하는 튜블린이 생쥐 항- α -튜블린과 항원-항체 특이 반응을 나타내고 금 입자 표지 항체 처리법(Ris, 1985; Yang *et al.*, 1997)이 미세 구조적 측면에서 가시성(可視性)을 제공하므로써 가능하였다.

재료 및 방법

연구에 사용된 실험 재료인 한국산 개불(*Urechis*

unicinctus)은 충남 서산군 남면 몽산포와 무창포 해변에서 干潮時에 채집하였으며 주로 2~5월 사이에 채집된 재료를 사용하거나 또는 이들을 실험실에서 배양한 것을 사용하였다. 실험실에서 배양한 것은 개불이 요구하는 온도 조건과 먹이인 플랑크톤을 공급하여 유지하였으며 이때 개불은 채집 당시 갖고 있던 정자를 상당 기간동안 체내에 그대로 유지하였고 정자 활성 유무를 관찰하기 위한 해수 처리 실험에서는 Shin (1992), Kwon (1994) 등의 보고와 같이 활성과 수정 능력이 있는 것으로 관찰되었다.

한국산 개불의 수컷은 암컷 보다 유선(流線)이 약하므로 대략 암, 수를 구별할 수 있었다. 재료인 정자는 수컷의 체벽을 종축을 따라 해부하고 2쌍의 정소를 채취한 후 PBSB (phosphate buffer, 0.1 M; saline 0.15 M; 1% BSA; pH 7.2)에서 세척하였다. 이때 BSA는 열 처리하여 불활성화된 BSA (Slot and Geuze, 1989)를 사용하였다. 개불 정자 편모 axoneme의 미세소관은 glutaraldehyde 등의 고정액에 매우 예민하여 정자의 전체 구조를 관찰하기 어려웠다. Axoneme의 고정액에 대한 예민성을 해결하고 항원-항체 반응을 유도하기 위하여 다음과 같이 몇 가지는 변형된 것을 제외하고는 De May (1983)의 방법을 사용하였다.

재료는 대조군과 실험군으로 나누어 2가지 방법으로 고정하였다. 대조군은 0.1 M 인산 완충 용액으로 0.5% glutaraldehyde를 포함한 4% paraformaldehyde에 4시간 고정 후 2.5% glutaraldehyde에 2시간, 인산 완충 용액으로 세척, OsO₄에 2시간의 순서로 고정하였다. 재료는 알코올 농도 상승순으로 탈수하고 araldite에 포매되어 45°C에서 4일간 중합되었다. 재료를 처리하는 각 단계에서 정자를 모으기 위하여 저속으로 15분간 원심 분리하였으나 이는 초기에 필요했을 뿐 몇 단계 후에는 정자가 응집되었으므로 이 과정이 필요하지 않았다. 실험군인 항- α -튜블린 (anti- α -tubulin) 반응군은 위의 1차 고정 후 탈수하고 araldite에 포매하였다. Bolck은 대조군과 같은 방법으로 포매되고 중합된 후 70~80 nm로 초박절편 하였다. 초박절편은 니켈 (nickel) grids에 부착하고 10% H₂O₂로 부각하였으며 PBSB로 제조한 gelatin (pH 7.2)과 glycine 용액으로 처리하였다. 시료를 PBSB

에 세척한 후 PBSB에 1:1,000 혹은 1:2,000배 희석한 monoclonal 항- α -튜블린 (mouse IgG1 iso-type, Sigma)을 1시간 동안 처리하여 정자 미세소관의 튜블린에서 α -튜블린 C-말단의 티로신 (tyrosine) 잔기를 인식하도록 하였다. 이 후 재료는 4회 세척하고 PBSB에 1:200으로 희석하여 금 입자의 농도를 $5.85 \times 10^{10}/\text{ml}$ 로 조절한 Gold (10 nm) conjugated goat anti-mouse IgG로 1 시간 동안 처리하여 시료에 금 입자를 표지 하였다. 이후 시료를 PBSB에 세척하고 1% glutaraldehyde와, 0.2% OsO₄에 각각 1 분 동안 처리하였으며 증류수로 여러 번 세척하였다. 절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였으며 Jeol 1010 B 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. Sperm ball

본 실험의 결과 지금까지 “저장낭 (storage sac)”이라고 알려진 맹낭으로부터 체세포와 발생 단계의 응성 생식세포들로 구성된 sperm ball의 존재가 밝혀지므로 이 기관이 정소인 것으로 관찰되었다. 개불 (*U. unicinctus*)의 정소는 구부 부근에 2쌍이 있으며 체벽의 배출공에 열린다. 정소는 생식기인 4월부터 5월초까지 정자로 채워져 있으며 이후에는 맹낭으로 존재한다. 생식기가 시작되는 2월에 채집한 개불 정자의 성숙도는 정소의 위치에 따라 상이해서 체벽 근접부인 기부 또는 상층에서는 성숙 정자를, 정소의 단부 또는 하층에서는 여러 발생 단계의 생식세포와 sperm ball이 채취되었다. 한편, 재료 및 실험 방법에서와 같이 실험실에서 배양한 개불은 생식세포를 채집할 당시의 상태로 체내에 보관하였으며 요구하는 온도 조건과 먹이인 플랑크톤 공급이 원활한 상태에서는 in vitro 해수 실험에서 정자의 활성, 난자의 수정 능력 등이 채집시와 유사하게 유지되었다. 정소로부터 채취한 정자는 체강에서 채취한 것과는 달리 해수로 처리하기 전에는 활성을 나타내지 않았다.

Sperm ball은 주로 정소의 하층에서 채취되고 단일 체세포와 다수의 응성 생식세포로 구성되며 $16 \times 20 \mu\text{m}$ 의 난원형이다 (Fig. 1). 체세포의 핵 ($4.5 \times 3.5 \mu\text{m}$)은 여러 개의 엽을 갖고 이질 염색질이 핵막 주

위에 발달하고 있다. 체세포의 세포 소기관은 발달한 편이 아니며 포화 지방적이라고 생각되는 구조가 다수 관찰된다. 응성 생식세포들은 체세포 내에 세포막으로 둘러싸여 형성된 구조인 perispermatoocyte space (3 μm ~5 μm) 속에 있으며 핵의 응축 정도, 침체의 분화, 중심소체의 형성 등에 의하여 여러 발생 단계로 구별할 수 있었다 (Figs. 2a, b). 하나의 perispermatoocyte space에서 두 개의 정세포(spermatid)가 관찰되는 경우도 있으며 특히 핵 물질이 과립상인 과립형 핵과 과립이 없는 응축형 핵의 정세포가 보인다. 과립형은 비교적 체세포의 내부에 위치하고 응축형은 주로 표면 세포질(cortical cytoplasm)에 근접하는데, 표면 세포질은 때로 외부에 열리고 이를 통하여 정세포가 sperm ball의 체세포로부터 정소강(testis cavity)으로 분리되는 것으로 보인다(Figs. 1, 2b). 정세포가 분리된 체세포질에는 때로 강소(lumen)가 형성되고 이곳에 많은 경우 형태와 밀도가 일정하지 않은 물질이 축적되는 것을 관찰할 수 있었다.

이와 같이 sperm ball에서는 여러 발생 단계의 응성 생식세포들이 관찰되나 이들의 감수 분열 시기가 알려지지 않았고 고등동물의 경우와는 상이하았으므로 명확한 발생 단계를 구별할 수 없었다. 따라서 서술의 편의상 침체가 분명히 형성되었고 기부, 단부 중심소체 및 편모 형성이 시작된 과립형과 응축형 생식세포를 정세포(spermatid)로 하였고 sperm ball내부에 아직 분화되지 않은 세포를 총칭하여 응성 생식세포라고 하였으며 sperm ball로부터 분리된 정소강의 것을 정자라고 하였다. 과립형 세포를 정세포라고 한 것은 핵질이 과립형이라도 침체, 중심소체 등의 세포 기구들이 응축형과 유사하였고 sperm ball로부터 분리된 후 정소강에서 관찰되는 정자 중에도 핵 물질이 응축된 것도 있고 과립형도 있었기 때문이다. 과립형 또는 응축형 정자가 정소강에서 관찰되는 것은 자연 상태에서도 sperm ball로부터 정소강으로 분리되는 시기가 일정하지 않거나 혹은 실험 조건들로 인한 것으로 보인다.

Perispermatoocyte space에 있는 정세포의 세포 기구는 침체, 미토콘드리아, 기부 및 단부 중심소체 그리고 때로 편모의 일부가 관찰된다(Figs. 1, 2a, 2b). Perispermatoocyte space가 편모 부위까지 신장된 곳

은 좁고 이를 단면에서 보면 체세포질에 편모가 존재하는 것과 같이 보인다. 때로 정세포체는 sperm ball 내에 있으나 편모는 외부, 즉 정소강으로 돌출한 것을 관찰할 수 있다. 이는 본 실험의 항원-항체 반응의 결과 금 입자가 결합된 α -튜블린의 위치가 표지되므로 보다 명확히 관찰될 수 있었다(Fig. 3).

2. 정자의 구조

정소 하층의 정소강(testis cavity)에서 채취한 정자는 과립형 핵과 응축형 핵을 갖는 것이 관찰된다(Figs. 4, 5). 침체와 미토콘드리아는 과립형과 응축형 정자에서 형태적으로 유사하나 기부, 단부 중심소체와 manchette 미세소관 등은 상이하다. 과립형은 기부 및 성상(星狀)의 단부 중심소체를 갖으나 응축형에서는 기부 중심소체가 관찰되지 않고 manchette 미세소관과 성상(星狀)이 아닌 변형된 단부 중심소체가 관찰된다.

과립형에서 기부 중심소체는 외핵막에 연결되고 nuclear fossa내에 위치하며(Fig. 4) 단부 중심소체는 초기에는 nuclear fossa밖인 미토콘드리아 아래에서 볼 수 있으나 성숙도에 따라 점차 핵을 향하여 이동하는 것으로 보인다(Fig. 4). 이때 단부 중심소체에는 길이 100 nm로 끝이 분지된 9개의 arm이 형성되어 그 형태가 성상(星狀)으로 보이며(Figs. 4, 7) 이 arm들과 단부 중심소체의 말단에 연결되는 편모와는 구조적으로 밀접한 관계가 있는 것으로 관찰된다. 이후 단부 중심소체는 변형되어 성상으로 관찰되지 않는다(Figs. 4, 5, 9b). 기부와 단부 중심소체는 서로 직각이고 단부 중심소체는 정자의 장축에 평행하게 배열된 것으로 보인다. 정자 핵이 과립형에서 응축형이 되는 어떤 시기에 기부 중심소체를 연결하는 핵막이 소실되는 것으로 보이고 정소강의 응축형 정자에서는 기부 중심소체가 관찰되지 않으며 단부 중심소체는 보다 핵에 근접한다(Fig. 5).

정소 상층의 정소강에서 채취한 정자는 주로 머리와 편모로 구성되고 고등동물에서 볼수 있는 중편이 발달하지 않았다(Fig. 5). 침체(2 μm \times 500 nm)는 잘 발달한 편이고 핵 축의 중앙 함입부에 형성되며 perinuclear theca로서 핵과 구별된다(Fig. 3). 침체는 여러 각도에서 관찰한 소견을 종합하면 중앙에 지름 200

nm의 침체 간격(acrosomal space)이 형성된 원반형 혹은 환형(環形)으로 보이며 침체 물질은 농도 구배가 형성되어 내측은 밀도가 낮고 외측은 밀도가 높다(Figs. 2b, 4). 침체 간격의 내층은 입자상 침체 물질(acrosomal material)로 채워져 있고 중간층은 좁은 cord로서 침체와 연결되며 최 외곽은 중간층과 세포막과의 사이에 형성된다. 각 층은 막성 구조로 구분된다.

응축형 정자 핵의 중앙 횡단면을 보면 핵과 파상(波狀) 세포막 사이에서 다수의 manchette 미세소관이 관찰되고 이는 미토콘드리아의 위치까지 신장된 것을 볼 수 있다(Figs. 6, 8). 파상(波狀) 세포막은 침체와 핵 응축 정도, 편모 및 변형 단부 중심소체의 형태 등으로 보아서 성숙된 정자라고 할지라도 핵과 또는 편모에 밀착되지 않았고 특히 미토콘드리아 부위에서는 보다 확장되었다. 이 세포질 확장부에서 미토콘드리아와 약간의 입자상 물질을 관찰할 수 있다(Fig. 5).

미토콘드리아는 여러 각도에서 관찰할 때 1개인 것으로 보이며 지름 2 μm , 폭 0.5 μm 로 중앙부에 0.5 μm 의 구멍(세포질부)이 있는 환형(環形)이고 크리스테는 관상형(tubular type)인 것으로 관찰된다(Fig. 8). 이 구멍의 전반부 즉 핵과 미토콘드리아 사이는 nuclear fossa (580 \times 300 \times 600 nm)이며 여기에 기부 중심소체가 그리고 이와 근접하여 단부 중심소체가 위치한다. 편모는 단부 중심소체에 연결되고 axoneme의 직경은 100 nm이며 미세소관의 배열은 9+2이다.

3. 항-튜블린(tubulin) 처리 정자

α -튜블린 C-말단의 티로신(tyrosine) 잔기를 인식하는 생쥐 monoclonal 항- α -튜블린(1차 항체)을 처리한 개불(*Urechis unicinctus*) 정자 절편에 염소의 항-생쥐-IgG-금 입자(10 nm)로 표지한 결과는 정자 axoneme의 미세소관에 특이적으로 금 입자가 표지되므로써 개불 미세소관을 구성하는 물질 중 α -튜블린이 있다는 것을 나타내고 있다(Figs. 3, 9a, 9b, 9c 화살표). 표지된 금 입자는 전자 광학적 특성과 금 입자 외곽의 형태 및 크기로 잘 확인될 수 있었다. 시료는 제 1, 2차 항체로 처리한 후 별도의 과정에서 밀도 있게 세척하는 동안 fish skin gelatin, glycine, BSA 등으로 처리되어 과잉 aldehyde기를 제거하고

비 특이적 반응이 감소된 결과를 보였으며 비 특이적 반응은 0.1% 이하인 것으로 나타났다.

α -튜블린이 표지된 범위는 sperm ball 가장자리의 정세포와 정소강내 정자에서 manchette 미세소관, 기부 및 단부 중심소체 그리고 편모 등이었으며 특히 편모에는 다른 미세소관에서보다 높은 밀도로 표지된 것을 관찰할 수 있었다. Manchette 미세소관은 응축형 정자의 일부에서 표지 되는 것을 볼 수 있었으나 sperm ball내 정세포, 과립형 정자 및 일부 응축형 정자에서는 그 구조와 표지된 금 입자를 관찰할 수 없었다.

이 연구에 사용한 금 입자의 물질 인식 범위는 1 : 10의 희석 농도(1.17×10^{12} 입자/ml)에서 4 ng이나 (Sigma) 1 : 200의 희석에서도 상당량의 항- α -튜블린이 인지되는 것으로 보인다. 그러나 생쥐 항- α -튜블린의 희석도는 표지 능력에 차이가 있는 것으로 나타난다. 원칙적으로 1 : 1,000 또는 1 : 2,000의 희석도가 표지 범위에 영향을 주는 것은 아닌 것으로 보이나 표지 농도에는 영향을 주는 것으로 보인다. 즉 1 : 1,000으로 희석된 생쥐 항- α -튜블린의 금 입자 표지능은 axoneme의 미세소관에 고루 밀도 있게 분포하였으나 1 : 2,000으로 희석한 생쥐 항- α -튜블린에서는 편모에서 유사한 정도의 표지능을 보일 뿐 이외의 미세소관, 즉 중심소체 및 manchette 미세소관 등에서는 현저하게 금 입자의 농도가 낮았다.

고 찰

이 연구에서 사용한 생쥐의 IgG1 isotype인 monoclonal 항- α -튜블린이 개불의 튜블린을 특이적으로 인지할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 해변 무척추동물인 개불과 고등 척추동물인 생쥐 물질 사이에 항원-항체 반응 일어난다는 것은 두 동물의 튜블린 분자 사이에 유사성이 있다는 것을 의미할 수 있다. 튜블린 분자의 경우 이와 같이 여러 종류 사이에서 항원-항체 반응이 일어나는 현상은 다른 동물에서도 보고된 바 있는데 면역 형광법으로 연구한 배양 생쥐 세포가 성게 정자 편모의 outer doublet에 대한 항체와 반응하는 것이 관찰된 바 있으며(Weber, 1975; Harris and Rubin, 1987) 배양 *P. tridactylis*와 말 신장 세

포가 성체 난자 세포 골격의 미세소관에 대하여 반응한다는 것도 보고된 바 있다(Gorbsky and Borisy, 1985). 생쥐 monoclonal 항- α -튜블린은 위 보고된 동물 외에도 쥐, 원숭이, 닭에서 α -튜블린 C-말단의 tyrosine 잔기(Gly-(Glu)₃-Gly-(Glu)₂-Tyr)를 인지하는 것으로 보아서 이들 분자는 서로 유사하며 진화의 관점에서 매우 보수적인 분자로 보고된 바 있다(Hiller, 1993; LeDizet and Piperno, 1987). 이와 같은 현상은 본 연구에서도 분류 체계상 유관성이 희박한 해변 동물 개불과 생쥐 사이에서도 나타나므로서 그 유사성이 증명될 수 있었다. 한편 개불 정자 튜블린에 반응한 제1차 항체인 생쥐 monoclonal 항- α -튜블린과 제2차 항체인 염소 항-생쥐-IgG-금 입자(gold conjugated goat anti-mouse-IgG)의 반응은 매우 예민하여 개불 정자 편모 axoneme의 튜블린에 표지된 금 입자의 밀도로서 axoneme 튜블린의 농도를 정량화할 수 있을 것으로 생각되었다. 염소 항-생쥐-IgG-금 입자의 농도가 $1.17 \times 10^{12}/\text{ml}$ 일 때 mouse IgG는 4 ng을 인식할 수 있는 것으로 보고된 바 있으나(Jahn *et al.*, 1984; Piperno and Fuller, 1985) 이는 개불의 경우 시료를 과산화 수소에 처리하여 부식시키는 시간과 농도에 영향을 받는 것으로 보인다. 개불에서 항- α -튜블린에 대하여 금 입자로 표지 되는 부위는 axoneme의 미세소관으로 편모, 기부, 단부 중심소체 및 manchette 미세소관 등이었으며 구성 성분이 같은 α -튜블린이라도 개불의 경우 정자 편모에서 금 입자가 보다 많이 표지 되는 것으로 관찰되었다.

개불에는 계절에 따라 구조 변화가 심한 2쌍의 정소가 있고 정자는 sperm ball에서 발생한다. Sperm ball은 실질 정자 생성 단위이며 단일 체세포와 다수의 응성 생식세포로 구성된다. 생식세포는 일정한 단계까지 sperm ball에서 성장 분화하며 sperm ball로부터 분리한 후 정소강에서 최종 분화 단계를 거치는 것으로 보인다. 이 분화 과정은 핵 응축, 기부 중심소체의 소실, 단부 중심소체의 변형 및 편모 완성이 포함된 것으로 생각된다. 따라서 성숙 정자의 세포 기구는 잘 발달한 첨체, 응축된 핵질, 1개의 환형 미토콘드리아, 단부 중심소체 및 편모이며 고등 동물의 정자와 비교하여 중편은 발달하지 않았다. 성숙 정자는 정

소의 상층에 수집되고 수정시 체벽에 열리는 배출공으로 분비되는 것으로 보인다.

개불의 정소는 계절의 변화에 따라 발생과 퇴화를 반복하여 2월부터 5월초까지는 응성 생식세포를 포함하고 있으나 이후에는 응성 생식세포를 포함하지 않는 지름 1~2 mm, 길이 4~5 cm의 맹낭이다. 이 정소는 개불의 어떤 부위에서 발생한 정자(자성의 경우에는 난자)를 체외로 배출하기 전에 저장하는 기능을 갖고 있는 "저장낭(storage sac)"이라고 알려졌을 뿐 응성 생식세포 생성 기관으로서의 기능을 보고한 문헌은 찾아 볼수 없었다. 이의 원인은 계절에 따른 심한 변화와 생식세포 발생기간이 매우 짧다는 데 있는 것으로 추측된다. 그러나 이 연구에서 관찰된 sperm ball의 존재로서 지금까지 "저장낭"이라고 알려진 기관이 정소라는 것을 보여 주고 있으며 응성 생식세포의 실질 생성 단위는 sperm ball이라는 것을 알 수 있었다. 이는 예를 들어 자성의 경우 체강의 어떤 세포로부터 자성 생식세포가 발생하고 체강내에서 난자로 성숙한 후 "저장낭"에 저장된 후 수정시 체외로 배출된다는 보고(Gould-Somero, 1975)로부터 유추하여 응성에서도 유사한 경로를 거쳐 정자가 발생할 것이라는 추측과는 상이한 결과이다. 이 연구에서는 개불의 정자가 정소내의 sperm ball로부터 발생하여 정소내에서 성숙하고 분화된 후 체외로 배출되는 것을 보여주고 있다. 한편 개불에서는 위 정소와는 다르게 체강을 채우고 있는 체액에서도 정자 또는 난자가 관찰되고 분리할 수 있는데 이들의 유래에 대하여는 앞으로 연구가 필요할 것으로 생각된다.

개불의 정소는 다른 기관과 구조적으로 연계되지 않았으며 sperm ball은 형성된 후 다른 세포와 물리적으로 접촉하지 않는다. Sperm ball은 정소를 형성하는 외피로부터 어떤 종류의 상피가 분리되어 형성되는 것으로 추측된다. 하나의 sperm ball ($16 \times 20 \mu\text{m}$)은 정세포의 크기($\sim 3 \mu\text{m}$) 및 perispermatoocyte space ($4 \mu\text{m}$)를 감안하여 약 30~40개의 정자를 생산할 수 있는 것으로 보이나 sperm ball의 구성 요소인 체세포의 기능은 아직 알려지지 않았다. 이 세포는 고등 척추동물의 Sertoli 세포 등 부속세포와 유사한 기능을 갖는 것으로 생각되나 일반적으로 짧은 생식 기간 내에 영양 물질 공급을 위하여 생식세포와 체세포 사

이에 발달한 구조인 gap junction 또는 cytoplasmic bridge 등이 관찰되지 않고 있다. 체세포의 핵은 잘 발달하였으나 세포 소기관들은 잘 발달하지 않은 것으로 보아서 영양 공급 등 생식세포 발생에 필요한 물질을 보조하는 기능보다는 기계적인 기능이 크고 이로서 다른 기관과 구조적으로 연계되지 않은 정소내에서 효과적으로 정자를 생성하는 역할을 수행하는 것으로 생각되었다.

*Urechis caupo*를 재료로 사용한 in vitro 수정 실험에서는 정소 상층에서 분리한 정자가 수정 능력이 있는 성숙 정자라고 보고된 바 있다 (Gould-Somero, 1975). Jung 등 (1989)은 개불 정소 상층에서 채취한 정자는 체액에서 분리한 정자와 비교하여 활성이 없는 편이었으나 이들이 해수와 접촉하면 활발한 운동성을 나타내는 것을 관찰한 바 있으나 본 연구에서는 정소의 하층에서 분리한 정자에서도 동일한 현상이 있는 것으로 관찰된다. 이 현상은 높은 CO₂ 분압으로 pH 7.2를 유지하던 정자가 보다 낮은 CO₂ 분압과 pH 8인 해수에 노출되었을 때 발생하는 Na⁺/H⁺ 이온의 교환으로 정자의 pH가 7.6으로 변하므로써 호흡률이 증가하고 ATPase가 활성화 (Christen and Dixon, 1983; Bibring *et al.*, 1984; Clapper, 1985)되는 것으로 알려져 있으나 개불에서는 아직 형태적으로 분화가 완성되지 않은 정소 하층의 정자에서도 이와 같은 현상이 일어나는 것을 볼 수 있었다. 정소 하층의 정자는 sperm ball로부터는 분리된 직후의 정자라고 볼 수 있었고 이들의 기부 및 단부 중심소체와 manchette 미세소관, 변형 단부 중심소체의 유무와 이에 대한 항원-항체 반응성 그리고 미세구조로 볼 때 아직 발생 과정에 있는 정자라고 판단되었다. 분화 과정에서 정자의 형태는 많은 변화를 수반하고 이의 목적은 수정 능력과 효율성 있는 운동을 위하여 유체 역학적 형태와 이에 수반하는 운동 기구를 얻기 위함이라고 할 수 있다. 개불 정소의 하층에서 채취한 정자는 위에서와 같이 해수와 접촉하면 활성이 있으나 세포질의 체적과 미토콘드리아의 형태와 위치 그리고 편모의 형태 등으로 보아서 실험 조건이 아닌 자연 해변 환경에서는 수정 능력이 성숙 정자보다 저하될 것으로 생각되었다.

Axoneme 미세소관의 배열과 manchette 미세소관

등은 대개 동물 정자의 공통 구조이므로 (Witman *et al.*, 1978) 개불의 정자는 형태가 알려진 특히 고등 동물의 성숙 정자와 비교했을 때 진화의 정도가 높지 않은 것으로 생각된다. 예를 들어 머리의 핵이 원추형이 아니고 구형인 것 (Fawcett *et al.*, 1971; Fawcett, 1975), 미토콘드리아가 환형(環形) 또는 원반형이며 수가 적은 것 (Longo and Anderson, 1968), fibrous sheath를 갖지 않는 것 (Philips, 1980) 등은 생쥐 등 포유류의 성숙 정자와 비교했을 때 분화의 정도가 낮은 것으로 생각된다. 또 발생 과정의 어떤 시기에 manchette 미세소관이 출현하나 이는 정자의 핵을 유선형으로 변형하는 기능은 없는 것으로 생각되었다. 그러나 한편 첨체의 크기 (Franzén, 1983)나 부위에 따른 농도 차이 (Russel and Peterson, 1983), actin의 중합 공간인 첨체 간격 (acrosomal space)을 중심으로 첨체가 분리되고 발생 중에 기부 중심소체와 단부 중심소체가 잘 발달하며 기부 중심소체가 핵막과 연결된 것 그리고 편모가 단부 중심소체에 연결된 것 (Tiley, 1978) 등으로 보아서 극피 동물보다는 환형 동물 (Sato and Osanai, 1986)이나 연체 동물 (Hodgson and Bernard, 1986)의 체제를 갖는 것으로 생각된다. 한편 개불에서 정상(星狀)의 형태로부터 변형된 단부 중심소체가 기저소체 (basal body)의 기능을 갖는지의 여부는 아직 밝혀져 있지 않다.

결 론

1. 개불(*Urechis unicinctus*) 정자 형성 과정의 이른 시기는 sperm ball 내에서 수행되며 sperm ball은 단일 체세포와 여러 개의 응성 생식세포로 구성된다.
2. Sperm ball을 구성하는 체세포의 미세구조로 보아서 체세포의 기능은 보다 기계적인 역할을 수행하는 것으로 보인다.
3. 정세포의 기부 및 단부 중심소체 그리고 편모의 발생은 정세포가 체세포와 구조적으로 연관되어 있을 때 시작되고 이는 α -튜블린에 대한 항원-항체-금 입자 표지법 의해 미세 구조적으로 관찰되었다.
4. 정자의 첨체는 가운데 구멍이 있는 원반형(原盤形)이고 미토콘드리아는 환형(環形)이며 이의 중앙은 nuclear fossa로서 발생 단계에 따라 기부 및 단부

중심소체 또는 변형 단부 중심소체가 존재한다.

5. 지금까지 "저장낭"이라고 알려진 개불의 기관은 sperm ball을 포함하고 이들 sperm ball로부터 정자가 형성되므로 정자를 저장할 뿐만 아니라 정소의 기능을 갖는 것을 밝힐 수 있었다.

참 고 문 헌

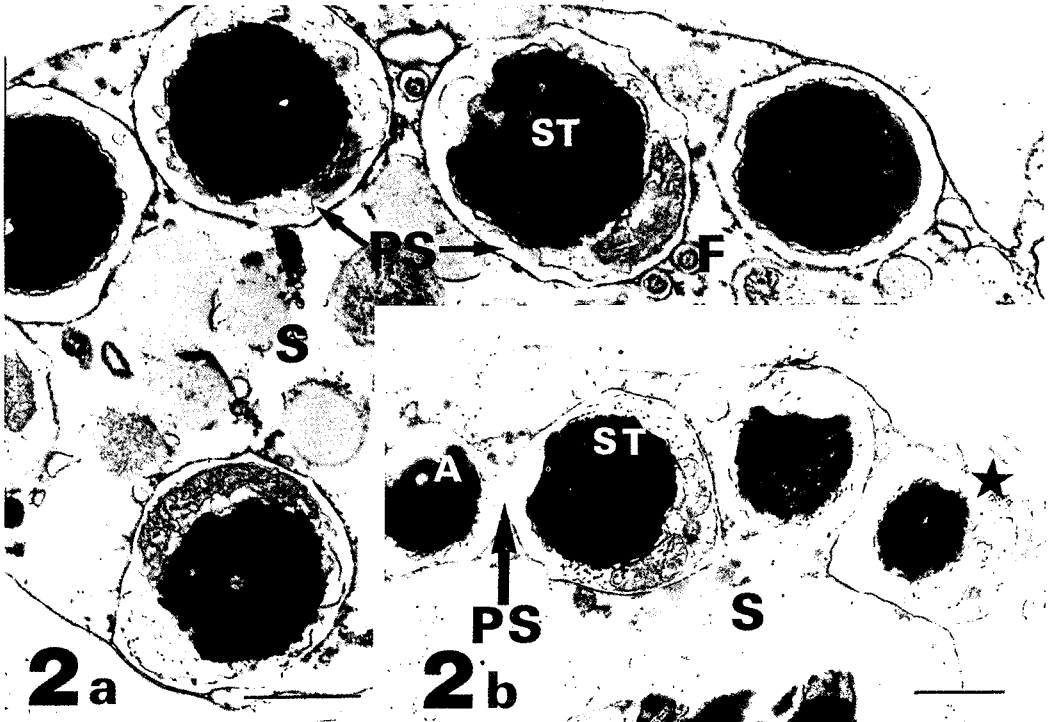
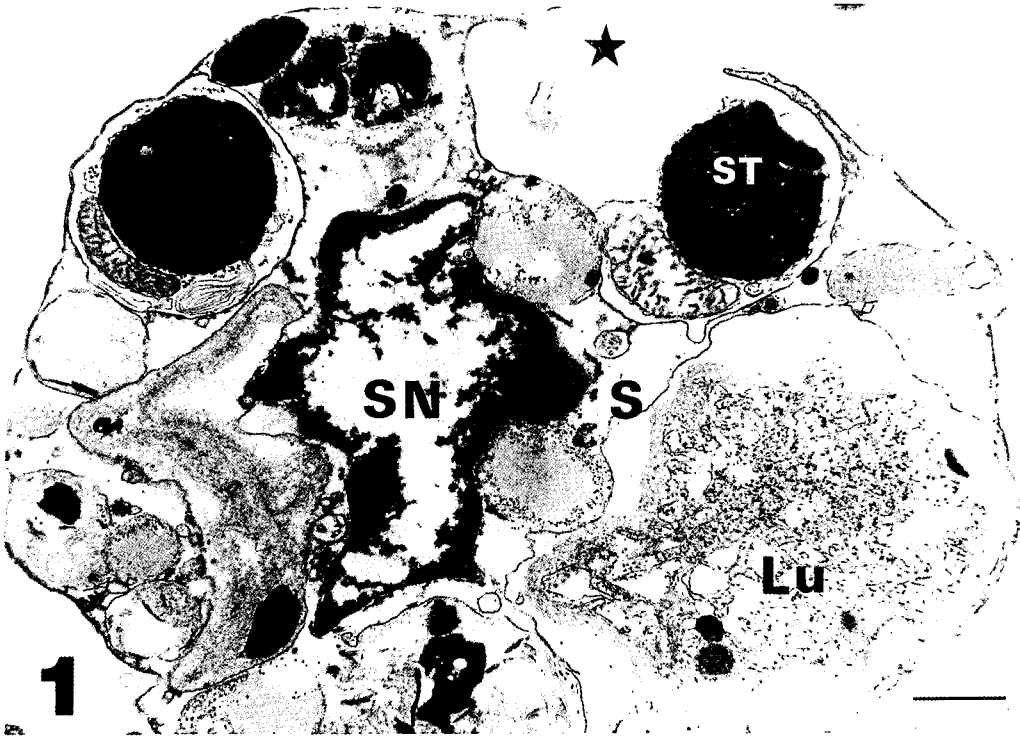
- Akowska JJ, Nelsen EM, Frankel J, 1982. Development of the ciliary pattern of the oral apparatus of *Tetrahymena thermophila*, J. Protozool. 29(1), 366-382
- Bibring T, Baxandall J, Harter CC, 1984. Sodium-dependent pH regulation in active sea urchin sperm, Dev. Biol. 101, 425-433
- Bradbury PC, Olive L S, 1980. Fine structure of the feeding stage of a sorogenic ciliate, *Sorogena stoianovitchae* gen. n., sp. n. Protozool. 27(3), 267-277
- Christen ME, Dixon GH, 1983. Hyperacetylation of histone H₄ correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout, Dev. Biol. 93, 404-415
- Clapper DL, 1985. Involvement of zinc in the regulation of pH, motility, and acrosome reactions in sea urchin sperm, J. Cell Biol. 100, 1817-1824
- De May JR, 1983. The preparation of immunoglobulin gold conjugates (IGS reagents) and their use as markers for light and electronmicroscopic immunohistochemistry. In "Immunohistochemistry" Cuello AC, ed, IBRO, Wiley, pp.347-372
- Fawcett DW, 1975. The mammalian spermatozoon, Dev. Biol. 44, 394-436
- Fawcett DW, Anderson WA, Philips DM, 1971. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head, Dev. Biol. 26, 220-251
- Franze'n A, 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa, Gamete Res. 2, 199-214
- Gibbons BH, Gibbons IR, Beccetti B, 1983. Structure and motility of the 9+0 flagellum of eel spermatozoa, J. Submicroc. Cytol. 15, 15-20.
- Gorbsky G, Borisy GG, 1985. Microtubule distribution in cultured cells and intact tissues : Improved immunolabelling resolution through the use of reversible embedment cytochemistry, PNAS, USA, 82, 6889-6893
- Gould-Somero M, Holland L, 1975. Oocyte differentiation in *Urechis caupo* (Echiura) : A fine structural study, J. Morphol. 147, 4765-505
- Hannes A, Foissner W, 1992. Morphologie und Oekologie einiger Ciliaten (Protozoa : Ciliophora) aus dem Belebtschlamm, Arch. Protistenkd. 141, 243-283
- Harris PJ, Rubin BP, 1987. Transition from mitosis to interphase in sea urchin first division : Immunofluorescence studies of tubulin distribution in methacrylate sections, J. Histochem. and Cytochem. 35(3), 343-349
- Hiller SA, 1993. Ultrastructure of Prorodon (Ciliophora, Prostomatida). Somatic cortex and some implications concerning kinetid evolution in Prostomatid and Colpodid Ciliate, J. Europ. Microbiol. 40(4), 467-486
- Hofmann-Muenz AH, 1991. The oral apparatus of *Colpoda variabilis* (Ciliophora, Colpodidae). II. Ultrastructure of the oral ciliature and its implications on ciliate phylogeny, Europ. Paratistol. 26, 288-302
- Hodgson AN, Bernard RTF, 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Molluska, Bivalvia), Gamet Res. 15, 123-135
- Jahn R, Schieber W, Greengard P, 1984. A quantitative dot immunoblotting assay for proteins using nitrocellulose membrane filters, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1684-1687
- Jung JW, Choe RS, Shin KS, Joo CN, 1989. The differentiation of the male gonial cell in the storage sac in Echiuroid, *Urechis unicinctus* : A fine structural study, Korean J. EM 19(1), 70-88
- Kwon HJ, Kim WJ, Shin KS, 1994. Structural changes of *Urechis unicinctus* oocytes after the artificial insemination, J. Soonchunhyang Univ.

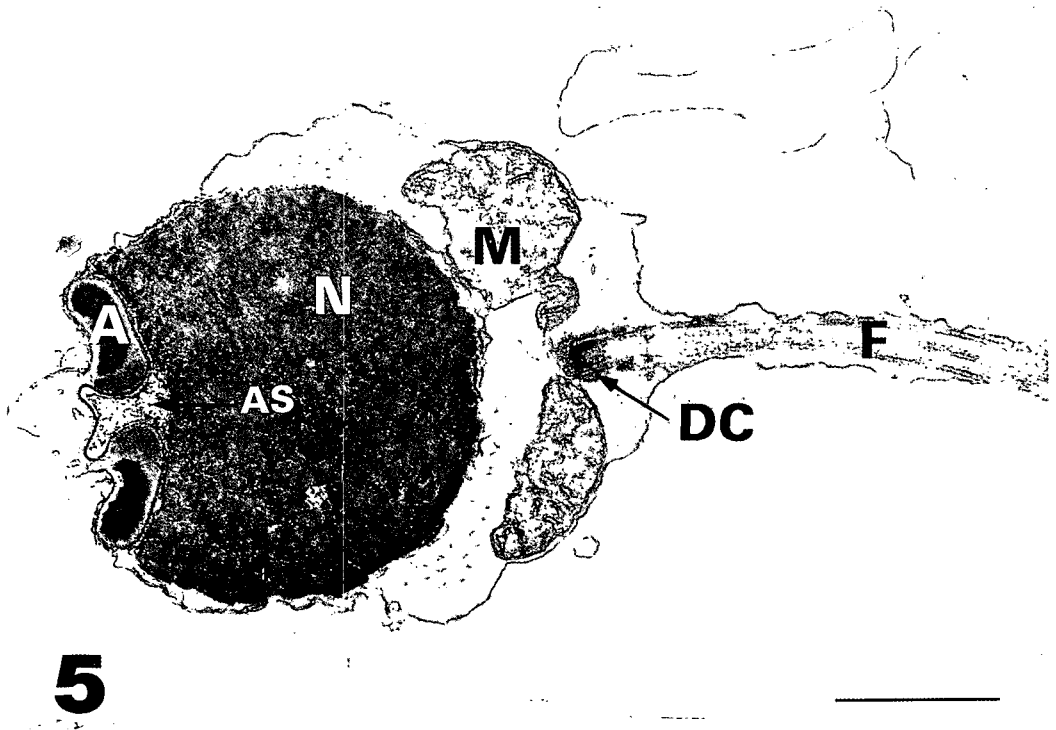
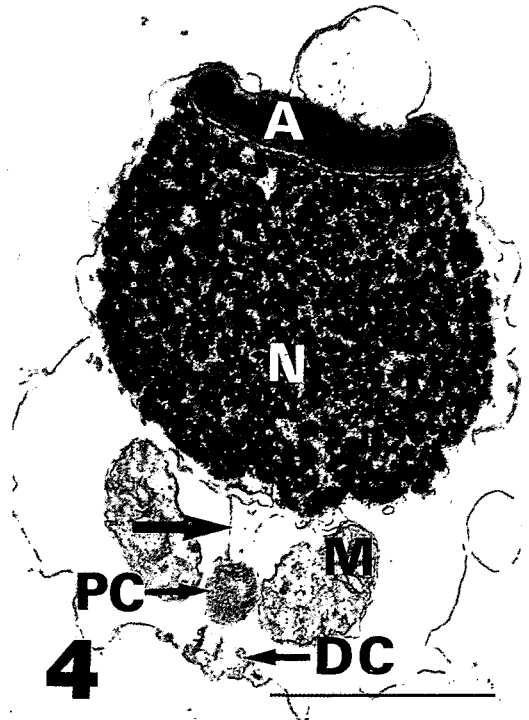
- 17(3), 1083-1092
- LeDizet M, Piperno G, 1987. Identification of an acetylation site of chlamydomonas α -tubulin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 5720-5724
- Longo FJ, Anderson E, 1968. The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, J. Cell Biol. 39, 339-368
- Ogawa K, Mohri T, Mohri H, 1977. Identification of dynein as the outer arms of sea urchin sperm axonemes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5006-5010
- Philips DM, 1980. Observations on mammalian spermiogenesis using surface replicas, J. Ultrastructure. Res. 72, 103-111
- Philips DM, 1983. Analysis of sperm motility, J. Submicroscop. Cytol. 15, 29-35
- Piperno G, LeDizet M, Chang XJ, 1987. Microtubule containing acetylated α -tubulin in mammalian cells in culture, J. Cell Biol. 104, 289-301
- Piperno G, Fuller MT, 1985. Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of α -tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organism, J. Cell Biol. 101, 2085-2994
- Raff EC, Frankenthal JD, Hutchens JA, Hoyle HD, Tumer FD, 1997. Microtubule architecture specified by β -tubulin, Science 275, 70-73
- Ris H, 1985. The cytoplasmic filament system in critical point-dried whole mounts and plastic-embedded sections, J. Cell Biol. 100, 1474-1487
- Russel LD, Peterson RN, 1983. Development of the acrosome and alignment, elongation and entrenchment of spermatids in procarbazine-treated rats, Tissue Cell, 15, 615-626
- Sato M, Osanai K, 1986. Morphological identification of sperm receptors above egg microvilli in the polychaete, *Neanthes japonica*, Developm. Biol. 113, 263-270
- Shin KS, Lee SH, 1997. The structure and its functional aspects of the cilia on epithelial cells in the fore gut of *Urechis unicinctus*, Soonchunhyang J. Natl. Sci. 3(1), 229-242
- Shin KS, 1992. Artificial insemination of *Urechis unicinctus* I : Development of ciliated blastula, J. Soonchunhyang Univ. 15(3), 889-897
- Slot JW, Geuze HJ, 1989. Immunolabelling for electron microscopy. In "Techniques in immunocytochemistry" vol. 4 G.R. Bullock ed, Elsevier Science, pp 67-93
- Tiley LG, 1978. The polymerization of actin. IV. The role of Ca^{++} and H^+ in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm, J. Cell Biol. 77, 536-550
- Warner FD, Satir P, 1974. The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding, J. Cell Biol. 63, 35-63
- Weber K, 1975. Specific visualization of tubulin containing structures in tissue culture cells by immunofluorescence, Exp. Cell Res. 95, 111-120
- Wehland J, Mark J, Willingham C, Sandoval IV, 1983. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of α -tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro and microtubule polymerization and organization in vivo, J. Cell Biol. 97, 1467-1475
- Witman GB, Plummer J, Sander G, 1978. Chlamydomonas flagella mutants lacking radial spokes and central tubules. Structure, composition, and function of specific axonemal components, J. Cell Biol. 76, 729-747
- Yang ZH, Gallicano GI, Yu QC, Fuchs E, 1997. An unexpected localization of basophilin in the centrosome, mitochondria, and acrosome of developing spermatids, J. Cell Biol. 137(3), 657-669

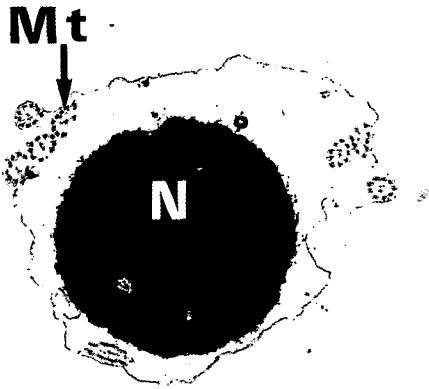
FIGURE LEGENDS

A, acrosome; AS, acrosomal space; DC, distal centriole; F, flagella; Lu, lumen; M, mitochondrion; Mt, microtubule; N, nucleus; PC, proximal centriole; PS, perispermatoocyte space; S, somatic cell; SN, somatic cell nucleus; ST, spermatid; Asterisk, cytoplasmic opening; Arrow head, gold particles.

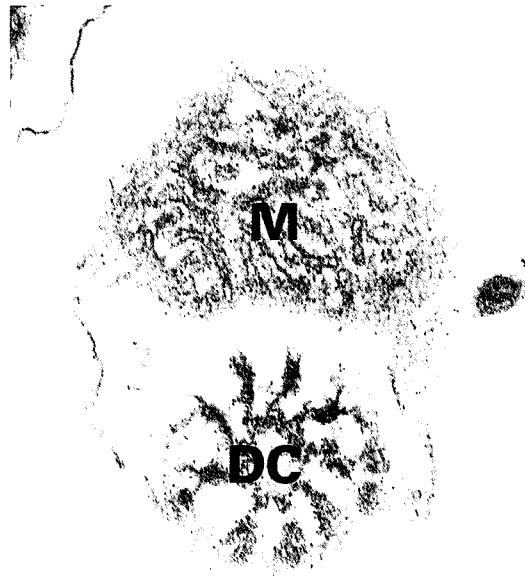
- Fig. 1.** A sperm ball prepared from the distal portion of *U. unicinctus* testis is composed of a somatic cell and spermatogenic cells of various developmental stages. A cortical cytoplasm of the somatic cell has already been disrupted to form an opening (asterisk) through which spermatid can be released into testis cavity. Bar : 1 μ m.
- Fig. 2a.** The spermatids develop in a perispermatoocyte space (PS) which is formed mainly at the cortical region of the somatic cell. Bar : 1 μ m.
- Fig. 2b.** Various developmental stages of spermatids in the sperm ball. The spermatids develop, divide, differentiate in the perispermatoocyte space and eventually are released into the testis cavity. The shape of acrosome is discoid with a central hole which is continuous with acrosomal space. Bar : 1 μ m.
- Fig. 3.** A gold (10 nm) conjugated goat anti-mouse IgG immunoreaction against α -tubulin of axoneme microtubule of the spermatogenic cells. The gold particles (arrow head) are incorporated with α -tubulin mainly on the flagella and distal centriole of the spermatids in the sperm ball. Bar : 1 μ m.
- Fig. 4.** An intermediate stage of sperm development. The typical features of this stage are the massive and gradient acrosome, granular nuclear materials, proximal and distal centrioles. Arrow indicates the nuclear outer membrane connecting with the proximal centriole in the nuclear fossa. Bar : 1 μ m.
- Fig. 5.** A mature spermatozoon prepared from the proximal portion of testis. The gradient acrosome is discoid with the acrosomal space (AS). The proximal centriole could not be observed at this stage and the distal centriole remains at the basal part of the flagellum. Bar : 1 μ m.
- Fig. 6.** Manchette microtubules appear in the vicinity of the nucleus at a developmental stage in the testis cavity. But the rather round head of the mature spermatozoon led to the suggestion that manchette microtubules are not the same in function as seen in mammalian sperm. Bar : 1 μ m.
- Fig. 7.** The 9 branched arms of the distal centriole can be seen during the polymerization of flagellum and there are evidences that the sperm flagella comes from the distal centriole. Bar : 500 nm.
- Fig. 8.** The tubular type of mitochondrion of *U. unicinctus* is one large ring form at least once during the developmental stages. Bar : 500 nm.
- Fig. 9.** A gold (10 nm) conjugated goat anti-mouse IgG immunoreaction against α -tubulin of axonem microtubule of mature sperm prepared from the proximal portion of testis. The gold particles (arrow head) are incorporated with α -tubulin on the manchette microtubules (9a), proximal and distal centrioles (9b) and flagellum (9c). Bar : 200 nm.



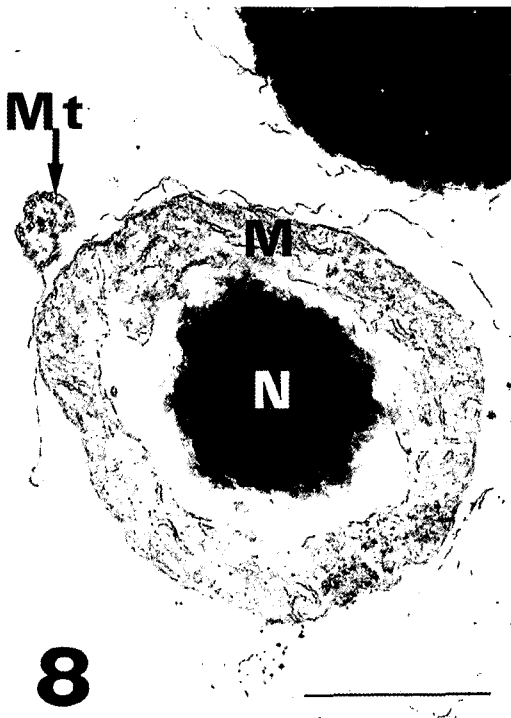




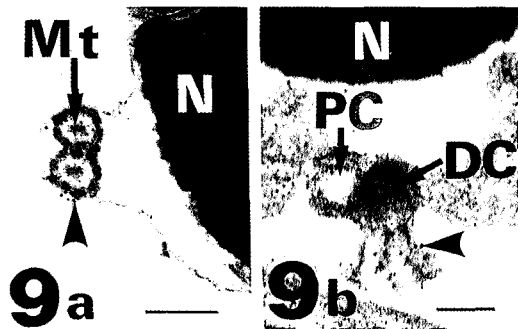
6



7

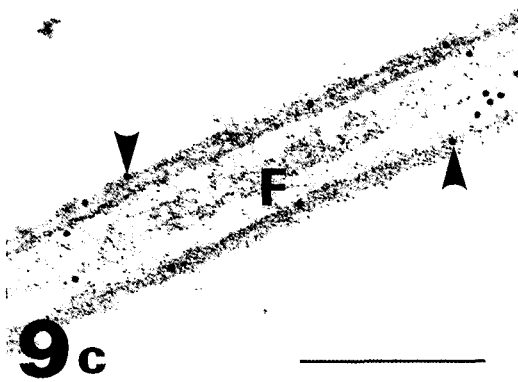


8



9a

9b



9c