

개불 (*Urechis unicinctus*) 체강에서의 단위집단 정자형성 (Solitary Spermatogenesis)에 관한 미세구조 연구

신길상, 김완종*
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

Fine Structural Study of Coelomic Solitary Spermatogenesis in *Urechis unicinctus*

Kil-Sang Shin and Wan-Jong Kim*

Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University,
Chungnam, Asan, 336-745, Korea

(Received April 6, 2002; Accepted May 24, 2002)

ABSTRACT

Early spermatocytes of *U. unicinctus* are found in cluster floating in the coelomic fluid. The spermatocytes in a cluster form a syncytium or cytoplasmic mass, but there are no indications that the cytoplasmic mass is a component of a somatic cell. This work suggested that this type of spermatogenesis can be subordinated to solitary spermatogenesis in the sense excluding structural and functional support of a somatic cell for sperm developments.

The solitary spermatogenesis in *U. unicinctus* is different in appearances and developmental details of sperm organelles and stage distributions from that of localized spermatogenesis. The acrosomal rudiments and centrioles can be observed in the early single cells of spermatogonia and clearly disclosed in the primary spermatocyte. In the stage of secondary spermatocyte, the acrosomal precursor and the centrioles begin to move to each cytoplasmic poles. The polarities of the organelles are attained at stage of spermatids. The spermatocytes and spermatids are arranged circumferentially along the cytoplasmic mass in which some amorphological cytoplasmic components are included. The spermatids reveal to be detached from the cytoplasmic mass into coelomic fluid. It suggests that the spermatogenesis are progressed in support of coelomic fluid, and the fact takes into consideration that the spermatogenic cells can be *in vitro* cultured without somatic cells and with supplements of coelomic fluid.

Key words : Solitary spermatogenesis, *Urechis unicinctus*

이 논문은 2001년도 순천향대학교 교내 학술비 지원에 의한 것임.

* Correspondence should be addressed to Dr. Wan-Jong Kim, Department of Life science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Chungnam, Asan, 336-745, Korea. Ph.: 041-530-1251, FAX: 041-530-1256, E-mail: wjkim56@mail.sch.ac.kr

Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

동물의 생식세포 형성은 생식세포들이 구조 및 기능에서 체세포와 연계되어 조직 및 기관을 형성하는가 혹은 조직을 형성하지 않는가에 따라 집단 생식세포 형성 (localized gametogenesis)과 분산형 또는 단위집단 생식세포 형성 (diffuse, solitary gametogenesis)으로 구분할 수 있다 (Korschelt & Heider, 1902). 알려진 많은 예인 포유류의 생식세포 형성 과정을 보면 생식세포들이 체세포와 집단을 형성하므로 집단 생식세포 형성 과정을 거치는 것으로 보인다. 이는 같은 조직에 속한 생식세포와 체세포의 구조 및 기능의 상호 관계를 전제로 하는 것으로 볼 수 있다. 한편, 단위집단 생식세포 형성 과정의 예는 많이 알려져 있지 않으나 갯지렁이 (*Platynereis dumerilii*; Fischer, 1974, 1975), 구두충 (*E. truttae*; Shin, 1986)의 난자형성과정에서 알려진 바 있고, *Urechis caupo* (Gould-Somero, 1975) 및 일부 해면동물 (Czihak, 1981)에서 추측된 바 있다. 그러나 이들의 정자 형성 과정도 동일한 과정을 거치는 것인지에 관한 보고는 알려져 있지 않다. *Urechis caupo*와 같은 속인 *U. uncinatus*에서 보면 정자 형성 과정이 단위집단에서 수행되는 것으로 관찰됨으로써 적어도 *Urechis*에서는 정자 형성과 난자 형성이 모두 단위집단에서 수행되는 것이 아닌가 추측할 수는 있었다.

집단 정자 형성에서 생식세포와 체세포의 상호관계는 세포막 접촉에 의한 정보 (signals) 교환, 틈 결합 (gap junction)을 통한 저분자 물질의 전달 및 호르몬의 영향에 의한 정보전달 (Griswold, 1988) 등으로 요약할 수 있으며 이는 생식세포 분화에 필요한 것으로 생각되고 있다. 단위집단 정자 형성에서는 특히 본 연구의 *U. uncinatus*의 정자 형성은 정보세포들이 집단을 형성하였으며 체강의 체액 속에 부유하는 자유 집단이었으며 본 연구의 미세구조 관찰에서 체세포의 존재가 확인되지 않았다. 이 정보세포 집단은 따라서 체세포와 연계된 것이 아니었고 조직을 형성하지 않은 것으로 볼 수 있었다. 이와 같은 단위집단 정자 형성에서는 응성 생식세포 형성의 전 과정을 통하여 체세포와의 접촉이 배제된 형식이었으며 때

우 드문 예인 것으로 생각되었으므로 그 특징에 대하여 관찰된 결과를 보고하고자 한다. 또한 일반적으로 보면 생식세포의 *in vitro* 배양의 어려운 점이 생식세포와 체세포의 적절한 상호 관계를 유지해야 된다는 사실 (Palombi, 1979; Tres & Kierszenbaum, 1983)을 감안할 때, *U. uncinatus* 생식세포는 체액 공급에 의한 기본 조건을 충족하면 *in vitro* 배양이 가능할 것으로 생각할 수도 있었으며 이러한 가능성을 타진하고자 한다.

재료 및 방법

연구에 사용된 실험 재료인 한국산 개불 (*Urechis uncinatus*)은 충남 서산군 남면 몽산포와 무장포 해변에서 干潮時에 채집하였으며 1월 중순~2월 사이에 채집된 재료를 사용하였다. 필요한 재료인 응성 생식세포들은 체강 액 속에 있었으므로 체강 액을 채취하기 위해서 수컷의 체벽을 종축을 따라 해부하고 petri dish에 체액을 수집하거나 주사기를 사용하여 채취하였다. 이 시기에 2쌍의 정소는 구부 (proboscis)의 체벽 안쪽에서 볼 수 있었으며 아직 발달하지 않았거나 또는 부분적으로 팽대되는 것을 볼 수 있었다.

채취된 15~30 ml의 체강 액에는 생식주기에 따라 다를 수 있으나 본 재료에서는 주로 혈액세포인 체강세포 (coelomocyte)와 소수의 식작용 세포 (phagocyte) 및 집단 (cluster)을 형성하는 세포들이 있다. 아직 살아있는 세포들을 광학 현미경으로 관찰하면 집단을 이루는 어떤 세포들에는 다수의 운동성을 지니는 편모들이 관찰된다. 한편 압력에서도 유사한 세포 집단들이 관찰되지만 편모의 존재 여부로서 자성 혹은 응성 생식세포를 구별할 수 있었다.

여러 종류의 세포들이 포함된 체강 액은 4% formaldehyde + 0.5% glutaraldehyde로 24시간동안 고정 한 후 PBS로 여러 번 세척하였다. 재료는 2.5% glutaraldehyde로 24시간동안 재차 고정하고 PBS로 세척하였다. 2차 고정한 재료에는 체강세포 등 다른 세포들이 혼합되어 있으므로 이를 구분하기 위해서 600 xg로 5분간 원심분리하고 세포성분을 4층으로 분리

하였다. 상층에는 주로 비교적 긴 편모를 갖는 세포 집단들, 중간 상층에는 편모가 짧은 세포 집단, 중간 하층에는 체강세포, 그리고 하층에는 편모가 없는 세포 집단들과 식세포들이 혼합되어 있었다.

각 층의 웅성 생식세포들은 각각 1% OsO₄에 24시간 이상 고정하였고 농도 상승 순의 알코올과 아세톤의 탈수과정을 거쳤다. 탈수 과정에서 각 단계에서 정자를 모으기 위하여 100xg로 3분간 원심 분리하였으나 이는 초기에 필요했을 뿐 이후에는 세포의 침전 속도가 빨랐으므로 이 과정이 필요하지 않았다. 재료는 아랄다이트(araldite)에 포매하고 45°C에서 4일간 중합하였으며 절편을 제작한 후 필요한 경우에는 재차 70°C에 수 시간 처리하였다. 박절편은 Richardson액으로 염색하고 초박절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였으며 Jeol 1010 B 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경 관찰

1-2월에 채집한 웅성 개불의 체강 또는 체강 액 속에는 편모 운동이 활발한 웅성 생식세포 집단들이 무수히 부유하고 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 1). 세포 집단들의 크기와 형태는 다양하였으며 때로 체액 속에 분리된 정자와 이들의 운동을 볼 수 있다. 이 관찰 결과와 미세구조로써 이들이 웅성 생식세포의 집단임을 알 수 있었고 따라서 웅성 생식세포들은 발생 단계에서 집단을 형성하는 것을 알 수 있었다. 수많은 이들 웅성 생식세포들의 집단은 혈액세포인 체강세포들 사이에 있는 부유성 세포 집단이며 조직을 형성하지 않는 것을 볼 수 있다.

웅성 생식세포 집단을 아랄다이트(araldite)에 포매한 박절편으로 관찰하면 여러 발생 단계인 생식세포들인 것을 볼 수 있다(Fig. 2). 핵의 염색성이 높고 작으며 편모를 갖는 세포 집단, 균질성이며 비교적 큰 핵을 갖는 세포 집단, 그리고 크기는 중간 정도이나 이질성 핵질(nuclear matrices)을 갖는 것으로 다른 세포 집단과 구별되는 세포의 집단들을 관찰할 수 있었다. 광학현미경 관찰 결과는 이 웅성 생식세포들

이 집단(cluster) 내지는 응집체(aggregate)로서 체세포 핵을 갖지 않는 것으로 보이는 한편, 체강 액 속에 부유하고 있어서, 다른 체세포 또는 조직과 구조적으로 연계되지 않는 것으로 보인다.

이와 같이 개불 체강에서 웅성 생식세포들이 집단이나 응집체를 형성하며 조직을 형성하지 않는 것은 동물 생식세포 형성 과정의 일반적인 예와 비교하여 다소 특이한 경우로 볼 수 있었고, 개불에서도 아직 보고된 예가 없었으며 또 한 세포 집단에 여러 발생 단계의 웅성 생식세포들이 관찰됨으로써 각 발생 단계를 규정하기 어려웠다. 본 연구에서 사용한 각 발생 단계에 대한 명칭은 감수분열에 따른 핵형 분화 단계와 편모 및 침체 등 웅성 생식세포 기구의 생성 단계 등을 고려하였으나 같은 극피동물(Echiuroid)에 속하는 성게의 경우를 참조하여 서술하였다(고찰 참조).

본 연구에서는 완성 단계의 편모와 침체, 그리고 물질 농도가 높은 가장 작은 핵(2 μ m)을 가지나 아직 집단에 소속된 세포를 정세포(spermatid), 세포 집단에 소속되어 있으나 아직 편모와 침체가 완성단계에 이르지 않았으며 핵의 크기가 2.5 μ m인 세포를 제2정모세포, 그리고 아직 집단을 형성하지는 않았으나 세포들이 모여서 집단화 성향, 즉 응집체를 이루며 침체와 중심소체의 흔적이 출현하기 시작하며 비교적 균질성 핵질을 가지며 크기가 7.5 \times 6 μ m인 세포를 제1정모세포로 서술하였다. 또한 핵의 크기가 3 \times 2.5 μ m이고 이질 염색질을 다량 포함하고 있으나 때로 세포질에서 중심소체 및 침체의 흔적이 관찰되는 단일세포를 정원세포로 서술하였다. 단일 세포라는 점에서 정원세포는 혈액 세포와 유사하여 구별하기 쉽지 않았으나 위에서와 같이 이들은 혈액세포들과는 달리 응집체를 형성하는 성향을 보이고 있었으며 침체의 흔적 및 중심소체를 관찰할 수 있었기 때문이었다. 따라서 세포 집단은 세포막이 융합 혹은 불완전 세포질 분열로 인하여 공통 세포질에 다수의 핵이 매몰된 것에 대하여 사용하였고, 응집체는 세포질이 아직 상통하지 않은 상태이나 매우 근접 또는 접촉하는 것에 대하여 사용하였다. 응집체를 형성하는 세포들은 원칙적으로 단일세포로 볼 수 있는 것이었다.

박질편에서도 단일 세포인 정원세포는 이질 염색질을 갖는 것으로 보이고, 제1정모세포는 다소 크고 균질성 핵을 갖는 세포의 집단으로, 그리고 정세포 집단은 물질 농도가 가장 높고 핵이 가장 작으며 외곽에 편모의 흔적을 볼 수 있는 세포집단인 것을 볼 수 있었다. 제2정모세포 집단은 핵의 크기가 정세포의 핵과 유사하고 제1정모세포 핵 보다 작았으며 세포의 원심성 배열 성향이 분명하였으나 제2정모세포 집단에 비교하여 외곽에 편모 다발의 흔적이 잘 관찰되지 않는 것 등의 차이가 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

2. 전자현미경 관찰

1) 정원세포

핵의 크기는 $3 \times 2.5 \mu\text{m}$ 였고 다량의 이질 염색질을 포함하고 있으며 서로 매우 근접되어 있으나 세포질이 상통하지 않은 단일 세포인 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 때로 핵형으로 보아서 정원세포에 속하는 단일 세포 중에서 세포질이 신장된 것을 볼 수 있었으며 이때 수는 많지 않았으나 중심소체 및 침체의 흔적을 갖는 세포들도 관찰될 수 있었다(Fig. 4). 실제로 침체의 흔적과 중심소체들이 이 시기에 출현함으로써 정원세포들이 체세포인 혈액세포들과 구별될 수 있었으며 핵의 형태와 크기만으로는 구별이 어려울 수 있었다.

2) 제1정모세포

제1정모세포의 핵은 *U. uncinatus* 체강에서 관찰되는 웅성 생식세포 중 가장 크고 비교적 균질성 핵질을 갖는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 정원세포질에서 볼 수 있었던 침체의 흔적은 보다 명확해지고 크기도 증가한 것을 볼 수 있었다. 제1정모세포들은 아직 확실한 세포 집단을 형성하지는 않았으나 정원세포들이 응집체를 형성하는 단일 세포라는 점을 고려하면 제1정모세포의 세포질은 신장되었고 이들이 상호 융합 또는 접촉하는 경향이 분명하였으므로 본 연구에서는 집단으로 분류할 수 있었다(Fig. 6).

핵은 $7.5 \times 6 \mu\text{m}$ 의 타원형이고 세포는 한쪽이 둔하고 다른 쪽이 비교적 좁은 난원형이며 침체와 중심소체의 흔적은 서로 근접된 부분에서 출현하는 것으

로 보인다. 핵은 감수분열의 접합기(zygotene) 또는 태사기(pachytene) 단계의 특징을 볼 수 있었으며 세포질에는 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 의 미토콘드리아가 다수 관찰되었으며 어떤 경우에는 유사한 핵의 크기 및 핵질의 특성에도 상당한 길이의 편모가 발달한 것을 볼 수 있었다(Fig. 7).

3) 제2정모세포

*U. uncinatus*의 체강에서 수행되는 정자 발생과정 중에서 분명한 집단은 제2정모세포기에 형성하였으나 이 집단에는 위에서와 같이 제1 혹은 제2정모세포들이 존재된 것으로 보인다(Figs. 8, 9). 이와 같은 발생 단계의 존재는 제1정모세포기까지는 인식할 수 없었던 현상이었으므로 제1정모세포 이후에 나타나는 현상인 것으로 보인다. 제2정모세포의 특징은 물질 농도 구획이 명확한 침체가 출현하며 유사한 위치에서 편모가 직결된 단부 중심소체 및 미토콘드리아가 출현한다는 것이었다. 이들 제2정모세포 기구들은 세포 연결부에 대하여 측면에 처음 출현하지만 침체만이 미래의 정자 전면을 향해 이동하는 극성을 갖고 미토콘드리아와 중심소체 및 편모는 본래의 위치에 남는 것으로 관찰되었다. 미래 정자의 전면은 이들이 처음 출현한 반대 측면인 것으로 관찰되었다.

세포질 괴(cytoplasmic mass)의 연결부에 대한 미세구조는 물질이 이동하는 것과 같이 보이는 무형의 물질들을 볼 수 있었다(Fig. 8). 세포질 연결부 자체의 세포막 부위는 비후되지 않았으므로 세포질교(cytoplasmic bridge)로는 볼 수 없었고 연결부의 경계에서 자주 액포들이 관찰되고 있다. 형성 초기에는 세포질 괴 내부에 핵질의 일부 혹은 소포체의 파편과 같은 물질이 있을 뿐 전체로 보아서 일종의 액포와 같은 모습이었으나 후기에는 마치 핵 물질의 일부가 제2정모세포와 세포질 괴 사이를 이동하는 것과 같은 구조(Fig. 8)가 나타나거나, 막성 성분의 파편과 같이 관찰되었다(Fig. 9). 제2정모세포가 속한 세포질 괴의 크기는 전 단계의 것과 비교하여 상당히 증가하는 것으로 볼 수 있었으나 그 구조 자체에서 일정성을 관찰할 수는 없었고 또 수많은 초박질편 그리고 광학현미경 관찰에서도 이에 소속된 핵을 관찰할 수는 없었다.

제 2 정모세포 핵의 크기는 $2.5\mu\text{m}$ 정도이었고 핵질에는 핵 액포(nuclear vacuole)들이 다수 관찰되었다(Fig. 9). 편모가 신장되는 단부 중심소체와 침체 및 미토콘드리아($1\mu\text{m} \times 600\text{nm}$)는 유사한 위치의 세포질부, 즉 세포질 연결부 반대편에서 출현하나 연결부가 점차 좁아짐에 따라 침체가 반대편 측면으로 이동하는 것으로 보인다. 정세포와의 차이는 침체의 형태에서 잘 볼 수 있었다. 제 2 정모세포의 침체는 $1.5 \times 0.5\mu\text{m}$ 의 타원형이고 내부에 포함된 물질과 저농도의 균질성 물질이 혼재됨으로써 농도차이에 의하여 구획이 설정된 것과 같이 볼 수 있었다. 세포질 피 속에는 발생 단계가 진행됨에 따라 입자상 물질이 내재되는 것으로 보이고 또한 보다 많은 수의 제 2 정모세포들이 가장자리에 부착된 것을 볼 수 있었다(Fig. 10). 이때의 제 2 정모세포 핵은 보다 응축되었으며 침체의 형태는 점차 원반형으로 변화였고 침체 간격이나 perinuclear space 등도 볼 수 있었다.

4) 정세포

*U. unincinctus*의 정세포기에는 세포질 피 가장자리에 분포한 정세포들의 세포질 연결부가 좁아지는 경향이 분명하였으며 핵이 보다 응축되었으며 완성도 높은 원반형 침체 및 편모, 그리고 미토콘드리아를 볼 수 있었다(Fig. 11).

정원세포로부터 정세포기까지의 세포질 연결부를 관찰하면 시간이 경과함에 따라 점차 좁아지는 경향이 분명하였으므로 정세포 혹은 늦은 시기의 정세포들은 세포질 피로부터 체강 또는 체강 액 속으로 분리하는 구조로 인식될 수 있었다(Fig. 11). 중앙의 세포질 피와 정세포 사이의 세포질 연결부에서는 자주 크기와 형태가 일정하지 않은 액포가 관찰되었고 그 일부는 측면의 막성 구조와 접촉하는 것을 볼 수 있었다. 구형인 핵($2\mu\text{m}$)의 물질 농도는 전 단계 보다 높은 편이었고 핵 액포(nuclear vacuole)는 수와 크기에서 매우 감소하는 것을 볼 수 있었으며 핵 전체에 고루 분포하는 입자상 핵질을 볼 수 있었다(Fig. 11). 침체가 있는 핵 부위는 함입된 것을 볼 수 있고, 이 함입부 농도에 의해 구획 정립된 침체가 위치하는 것을 볼 수 있다(Figs. 11, 12). 이때 침체의 크기는 $2\mu\text{m} \times 500\text{nm}$ 이고, perinuclear space 및 theca로써 핵과

경계짓고 있다. 여러 절편에서 보면 침체는 가운데 200nm 지름의 침체간격(acrosomal space)을 갖는 원반형이었으며 그 외측 $1.5\mu\text{m}$ 정도의 넓이는 띠를 이루고 물질 농도가 높고 내측은 300nm 정도는 물질 농도가 보다 낮은 띠를 형성하고 있다. 길이가 약 $10\mu\text{m}$ 에 이르는 편모는 단부 중심소체에 직결되고 기부 중심소체는 핵막과 밀접한 관계를 갖는 것으로 관찰되었다. 때로 세포질 피로부터 분리된 직후의 것으로 볼 수 있는 정자에서 상당한 세포질이 부착된 것을 볼 수 있었다(Fig. 12).

고 찰

체강 또는 체액 속에서 수행되는 정자형성의 전 과정에서 *U. unincinctus* 응성 생식세포들은 집단(cluster) 혹은 응집체(aggregate)를 형성하였으나 이 집단에서는 체세포의 존재를 확인할 수 없었다. 체액 부유성인 이 집단은 생식세포로만 이루어진 집단이라는 사실은 생식세포 발생에 부속세포인 체세포가 반드시 필요한 후생동물의 예와는 매우 상이한 것으로 볼 수 있었다. 동물 생식세포들은 그 발생과정에서 부속세포와 구조로서 밀접하게 연계되고 기능에서 상호작용이 가능한 조직을 형성하는가의 여부에 따라 집단 생식세포 형성과정(localized gametogenesis)과 분산형 또는 단위집단 생식세포 형성과정(diffuse, solitary gametogenesis) 등 2가지 형식으로 구분할 수 있다(Korschelt & Heider, 1902). 이 분류에 의하면 *U. unincinctus*의 생식세포 형성형식은 단위집단 생식세포 형성 과정에 속하는 것으로 볼 수 있었으나 이와 같은 정자완성 과정을 다룬 보고와 예는 아직 잘 알려져 있지 않은 것으로 보인다. 한편, 단위집단 생식세포 형성과정 중에서 난자형성은 *Urechis*의 다른 종류인 *U. caupo* (Gould-Somero, 1975)와 갯지렁이(*P. dumerilli*; Fischer, 1974), 그리고 구두충(*E. trutae*; Shin, 1986)에서 찾아 볼 수 있었다. 원칙으로 보면 단위집단 혹은 집단 생식세포 형성과정 중에서 어떠한 종류의 동물이 선택한 생식세포 형성형식은 그 종류의 암, 수에서 동일하다(Korschelt & Heider, 1902)는 보고가 있으므로, 이들의 정자형성형식은 단위집

단 정자형성인 것으로 추측할 수 있으나 이를 보고한 문헌은 없는 것으로 보인다. *U. caupo*의 난자 형성에 관한 보고에서도 난세포가 체강에 단독 세포로 존재한다고 보고한 바 있으나 주로 난황형성기 이후의 난세포를 다룸으로써 발생 초기에 집단을 형성하는지 혹은 이들 집단이 체세포가 존재하는지의 여부에 관한 언급은 찾아 볼 수 없었다. 갯지렁이와 구두충의 난자들은 조직을 형성하지 않는 체액 부유성 집단인 ovarian ball에서 발생하고 ovarian ball은 체세포를 포함하고 있으므로 순수한 의미의 단위집단 난자형성은 아니지만 하나의 발생단위(집단)를 이룬다는 의미에서 단위집단 난자형성으로 분류된 바 있다. 이와 같은 예는 단위집단 생식세포 형성과정을 수행한다고 해도 생식세포 발생에는 체세포의 역할이 있다는 것을 의미하는 것으로 볼 수 있는 것이었으나 본 연구의 *U. uncinatus* 정자형성 과정에서 보면 체세포가 관찰되지 않았으므로 단위집단 정자형성의 의미와 적절히 부합할 수 있는 예인 것으로 생각할 수 있었다. *U. uncinatus*의 단위집단 정자형성 과정의 특징은 다음과 같이 볼 수 있었다.

*U. uncinatus*의 정원세포들은 체강에 부유하는 단독세포(single cell)이며 이질 염색질 및 핵형과 여러 형태적 특징으로 보면 혈액세포인 체강세포와 구별하기 매우 어려운 것으로 볼 수도 있었다. 이들이 정원세포라는 형태적 증거는 이 시기에 출현하는 중심소체 및 침체 흔적에서 볼 수 있었고 발생 후기로 이어지는 일련의 형태변화는 정모세포 및 정세포와 일치하는 cell lineage에 연결되는 것으로 볼 수 있을 뿐 아니라, 하나의 집단을 형성하는 형태적 특징들이 있었기 때문이었다. 정모세포 분화단계의 초기에는 세포질돌기에 의해 서로 연결되지만 후기 즉, 제2정모세포기에 이르르면 불완전 세포질 분열로 인하여 집단을 형성하는 것으로 보인다. 결과로 보면 집단을 형성하는 것은 첫째 세포수의 증가와 둘째 정모세포 및 정세포의 세포질 제거 및 핵 응축과 깊어 관계된 것으로 추측할 수 있었다. 면역 금 입자 처리에 의한 액틴의 위상을 관찰한 결과 핵이 응축하는 것은 핵질에 중합체로 존재하던 액틴 분자가 단량체로 변화하면서 이루어지는 현상이며 이는 주로 정모세포에서 정세포로 분화되는 단계에서 이루어진다(Shin, 1998)

는 연구 결과와 일치하였다.

이와 같이 *U. uncinatus* 정자발생은 잘 알려진 동물의 예와는 매우 상이한 점이 있었으므로 각 발생 단계를 규정하는 데 어려움이 있었다. *U. uncinatus*와 같이 단위집단 정자형성 과정을 수행하거나 또는 집단을 형성하는 경우가 아니지만 발생 단계를 규정하기 위해서는 같은 Echiuroid에 속하는 성체의 경우를 참조하였다(Holland & Giese, 1965; Holland, 1967). 위 문헌을 참조하면 *U. uncinatus* 응성 생식세포에서 집단을 형성하는 시기는 제1정모세포기이며 감수분열의 접합기(zygotene) 내지는 태사기(pachytene) 단계인 것으로 볼 수 있었다. 정원세포는 장간막(mesentery) 또는 체강상피(MacGinitie, 1935)에서 돌출하는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 이를 확인할 수 없었다. 형태로 보아서 제1정모세포들은 세포질 돌기들에 의해 융합하는 것으로 볼 수 있었다. 분명한 집단을 형성하는 시기는 제2정모세포기였으며 공동 세포질(symplasm)의 가장자리에 매몰된 핵과 같이 볼 수 있었고 그 수가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 공동세포질에서 체세포 핵을 관찰할 수 없었고 응성 생식세포 발생에 기여하는 능동적 역할이 없는 것으로 보았으므로 본 연구에서는 단순한 서술적 의미에서 “세포질 피(cytoplasmic mass)”라고 하였다. 제2정모세포와 세포질 피는 세포교와 유사한 연결부에 부착하고 있었으나 그 가장자리에서 비후성 막 구조가 관찰되지 않았으므로 세포교(cytoplasmic bridge, Fischer, 1975)로 볼 수는 없었다. 이때 침체와 중심소체 또는 편모의 흔적은 아직 정모세포의 양극으로 이동하는 극성을 보이지는 않았다.

제1정모세포 핵은 응축기 전 단계인 것으로 보인다. 침체 및 중심소체의 흔적 그리고 미토콘드리아 등 세포 기구의 극성과 핵 응축 현상은 주로 제2정모세포에서 정세포기로 변하는 시기에 나타나는 특징으로 볼 수 있었다. 정세포에서는 전 단계와 비교하여 응축된 핵 및 핵질(nuclear matrix)이 관찰되는 한편 집단에서 비 생식세포 부위인 세포질 피(mass)의 크기도 매우 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 제2감수분열과 핵 응축 및 세포질 감소가 동시에 이루어지는 것으로 볼 수 있는 현상이었다. 중앙의 세포질 피에 대하여 원심성 배열을 한 응성 생식세포

포들은 제2정모세포와 정세포들인 것으로 보아서 한 집단에 속한 음성 생식세포들이라도 이 단계에서는 발생의 동시성이 확보된다고는 볼 수 없었다. 일련의 연속 관찰로 보면 세포질 피와 정세포를 연결하는 세포 연결부는 점차 좁아짐으로써 후기에는 정세포가 여기서 체강으로 분리되는 것으로 볼 수 있었다.

정세포(spermatid)기는 편모, 기부 및 단부 중심소체와 미토콘드리아가 세포질 피에 대하여 원심성으로 그리고 침체는 구심성 극성이 완성되는 시기이며 양극의 고유 위치를 확보하고 원반형 침체가 완성되는 시기로 볼 수 있었다. 이때 편모의 길이는 10 μ m 정도이었다. 침체 내부는 물질 농도차이에 의한 구획이 분명하였고 집단에서 이미 분리한 정자 침체의 형태와 유사한 것이었다. 정자들은 공동 세포질 피 혹은 집단에서 분리한 후 무형의 점액성 물질 속에 매몰된다는 증거가 있으나 이들이 어떤 경로로서 집적되고 체외로 배출되며 수정의 기회를 갖는지에 대해서는 아직 밝혀진 바 없는 것으로 보인다.

집단 생식세포 형성과정을 수행하는 동물에서 생식세포 발생과정에 체세포의 참여가 필요하다는 것은 생식세포의 발생이 체세포와의 구조 및 기능적 상호작용에서만 가능하다는 것을 의미하는 것으로 알려져 있다(MacGuinness & Griswold, 1994). 이 관계는 체세포와 생식세포막의 접촉, 틈 결합(Simmon & Goodenough, 1998; Finbow, 1997), 접착반(Tepass & Hartenstein, 1994) 그리고 세포막 수용체(Ducibella et al., 1975) 등의 실질 구조를 통해 이루어지고 있으며, 이를 통한 상호 정보(signal) 교환(Griswold, 1988), Ca^{++} , cAMP 등과 같은 제2차 messenger 분자 및 막 단백질(Edelman, 1986; Orth & Boehm, 1990), 그리고 FSH, 테스토스테론 등 paracrine 물질의 교환(Galdieri et al., 1984) 등이 주요 내용인 것으로 알려져 있다. 관찰된 결과를 보면 적어도 *U. uncinatus* 음성 생식세포 형성은 이와 같은 체세포와의 상호작용을 배제하는 생식세포 형성형식을 갖는 것으로 볼 수 있었다. 그러나 *U. uncinatus*의 체강에는 15~30 ml의 체강성분이 있으며 $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{3}$ 정도의 체액을 제거하면 10,000/mm³개의 체강세포를 분리할 수 있다. 일반적인 예로 보아서 생식세포 발생이 체세포의 작용을 완전히 배제할 수 없는 것이라면 *U. uncinatus* 음성

생식세포의 발생은 생식세포와 체세포 사이에 발달한 위의 여러 가지 구조를 통한 직접적인 작용만을 배제할 뿐 체액을 통한 체세포와의 상호작용까지 배제하는 것으로는 볼 수 없었다. *U. uncinatus* 음성 생식세포에서의 결과는 생식세포의 *in vitro* 배양이 체세포의 직접적인 관여 없이는 가능하지 않다(Tres & Kierszenbaum, 1983)는 현재의 난점을 타개할 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료되었다. 본 연구와 평행하게 실행한 실험에서 *U. uncinatus* 음성 생식세포 집단은 무척추 동물 배양액에서 약 90시간 이상 생존하였으며 체액과 배양액의 비율이 설정되면 보다 긴 시간동안 생존 가능하다는 임시 실험 결과를 확보한 바 있다.

한편 *U. uncinatus*를 재료로 사용한 정자 편모의 α -튜블린에 관한 면역 세포화학적 연구에서 Shin (1998)은 산란기에 근접하는 시기에 그 일부가 점차 팽대하는 “저장낭(storage sac)”의 미세구조를 관찰하고 음성 생식세포가 하나의 체세포질에 매몰되어서 하나의 독립 단위를 이루는 sperm ball을 관찰한 바 있다. 따라서 sperm ball은 실질적인 정자형성 기능을 갖는 기관으로, 그리고 기부 종단이 체벽에 열리는 저장낭은 정소로 규정한 바 있다. 이 체강 기원과 정소 기원의 음성 생식세포 관계는 MacGinitie (1935)가 “체강” 기원 생식세포들이 각각의 “저장낭”에 축적된다고 보고한 바 있으나 Gould (1967)는 “저장낭”은 맹낭이고 생식세포들의 축적 경로 등에 관한 증거가 확보돼야 한다고 보고한 바 있다. 본 연구의 결과로 보면 sperm ball과 체강의 음성 생식세포 형성과정은 각각 별도의 cell lineage를 갖는 것으로 사료되며 정소에서는 sperm ball에 포함된 체세포의 직접 관여로, 체강에서는 간접적 관여로 수행되는 것이라고 볼 수 있는 결과였다. 한편, 체강의 음성 생식세포 집단에는 체세포가 존재하지 않는다는 사실은 본 연구의 분명한 결과라는 사실로 볼 때 *U. uncinatus*의 음성 생식세포 형성과정은 현재로서는 이원성(dual origin)을 갖는 것으로 사료되었다. 이와 같은 예는 동물계에서는 아직 찾아 볼 수 없으며 이원성 기원의 정자들이 동일한 수정의 기회 및 수정력을 갖는지에 대해서도 알려진 바가 없다. 난자형성 과정이 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나 *U. uncinatus*의 생식세포 형성의

이원적 cell lineage는 이를 주도하는 별도 정원세포들의 존재 여부 및 감수분열 유전인자의 선택적 발현 특성(Kelly 1977; Su et al., 1998; Wickramasinghe & Albertini, 1993) 및 그 작용 기작 등의 문제에 접근하기 위한 좋은 재료인 것으로 생각할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Czihak G, Langer H, Ziegler H: Fortpflanzung und sexualitaet. In Biologie. 3te Aufl. pp 239 278, Springer Verl. Berlin Heidelberg New York, 1981.
- Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Bigger JD: The preimplantation mammalian embryo: Characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev Biol* 45: 231 250, 1975.
- Edelman GM: Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Ann Rev Cell Biol* 2: 81 116, 1986.
- Finbow ME: Vertebrate and invertebrate gap junction: A common molecular basis? *Cell Biol Int* 21: 329 331, 1997.
- Fischer A: The structure of symplasmic early oocytes and their enveloping sheath cells in the Polychaete, *Platynereis dumerilli*. *Cell Tiss Res* 160: 273 343, 1975.
- Fischer A: Stages and stage distribution in early oogenesis in the annelid, *Platynereis dumerilli*. *Cell Tiss Res* 156: 35 45, 1974.
- Galdieri M, Monaco L, Stefanini M: Secretion of androgen binding protein by Sertoli cells is influenced by contact with germ cells. *J Androl* 5: 409 415, 1984.
- Gould M: Echiuroid worm: *Urechis*. In "Methods in developmental biology" Wild FH ed. Univ. Berkely, 1967.
- Gould Somero M, Holland L: Oocyte differentiation in *Urechis caupo* (Echiura): A Fine structural study. *J Morphol* 147: 475 505, 1975.
- Griswold MD: Protein secretion of Sertoli cells. *Int Rev Cytol* 110: 133 156.
- Holland ND: Gametogenesis during the annual reproductive cycle in cidaroid sea urchin (*Stylocidaris affinis*). *Biol Bull* 133: 578 590, 1967.
- Holland ND, Giese AC: An autoradiographic investigation of the gonad of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Biol Bull* 128: 241 258, 1965.
- Kelly SJ: Studies of the developmental potential of 4 and 8 cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* 200: 365 376, 1977.
- Korschelt E, Heider K: Lehrbuch der Vergleichenden Entwicklungsgeschichte der Tiere. Jena: Gustav Fischer, 1902.
- MacGinitie G: Normal functioning and experimental behavior of the egg and sperm collectors of the Echiuroid, *Urechis caupo*. *J Exp Zool* 70: 341 355, 1935.
- MacGuinness MP, Griswold MD: Interactions between Sertoli cells and germ cells in the testis Seminars in *Dev Biol* 5: 61 66, 1994.
- Orth JM, Boehm R: Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. *Endocrinol* 127: 2812 2820, 1990.
- Palombi F, Ziparo E, Rommerts FF, Grootegeod JA, Antonini M, Stefanini M: Morphological characteristics of male germ cells of rats in contact with Sertoli cells *in vitro*. *J Reprod Fert* 57: 325 330, 1979.
- Shin KS: The fine structure of the sperm ball and sperm of *Urechis unicinctus* and immunogold localization of α tubulin. *Korean J Electron Microsc* 28: 193 205, 1998. Korean
- Shin KS: Contribution of the body fluid to egg envelope formation in *Echinorhynchus truttae* (Acanthocephala). *J Electron Microsc* 35: 227 236, 1986.
- Simmon AM, Goodenough DA: Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends cell Biol* 8: 447 483, 1998.
- Su TT, Campbell SD, O'Farrel PH: The cell cycle program in germ cells of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 196: 160 170, 1998.
- Tepass U, Hartenstein V: The development of cellular junctions in *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 161: 563 596, 1994.
- Tres LL, Kierszenbaum AL: Variability of rat spermatogenic cells *in vitro* is facilitated by their cocultures of male germ cells of rats in contact with Sertoli cells *in vitro*. *J Reprod Fert* 57: 325 330, 1983.
- Wickramasinghe D, Albertini DF: Cell cycle control during mammalian oogenesis. *Curr Top Dev Biol* 28: 125 153, 1993.

< 국문초록 >

*U. unicinctus*의 초기 정자형성 과정은 체액 부유성

웅성 생식세포 집단(cluster)에서 수행되는 것으로 관찰되었다. 이들 웅성 생식세포 집단은 체강의 체액 속에 산재하고 다른 체세포와 특정 구조 또는 조직을 형성하지 않았으므로 분산형 정자형성(diffuse spermatogenesis) 또는 단위집단 정자형성(solitary spermatogenesis) 과정을 거치는 것으로 볼 수 있었다. 단위집단 정자형성과 정은 생식세포들이 체세포와 함께 조직을 형성하는 포유동물의 집단 정자형성(localized spermatogenesis)과 비교하여 미세구조 측면에서 여러 가지 특징을 갖는 것으로 관찰되었다.

*U. unincinctus*의 단위집단 정자형성에서 웅성 생식세포 발생단계는 핵의 크기, 핵질(nuclear matrices)의 위상 그리고 핵 응축도 및 웅성 생식세포 기관의 발달 상태를 고려하여 따로 분류하였다. 정원세포와 제 1 정모세포의 차이는 핵질의 위상에서 분명하였고, 정모세포와 정세포는 핵 응축도에서 차이를 볼 수 있었다. 단위집단을

형성하는 시기는 정원세포기로서 각 정원세포 돌기들이 서로 융합한다는 증거를 볼 수 있었다. 제 1, 제 2 정모세포 그리고 정세포들은 단위집단의 외곽에 부착하고 있었으며 내부에는 웅성 생식세포 응축 과정에 수반되어 분리된 또는 제거된 세포질 성분(cytoplasmic mass)이 채워지는 것으로 볼 수 있었다. 성숙 후 단위집단에서 체강으로 분리되는 시기는 정세포기이며, 체강에서 관찰된 성숙정자는 물질농도에서 구획이 형성된 원반형 침체, 미토콘드리아와 편모의 구조로 보아서 운동성과 수정력이 있는 것으로 보인다. 이와 같은 단위집단 생식세포 형성은 체액을 통한 간접 방법에 의해 대사 작용에 필요한 정보와 물질을 교환하기 때문에 가능한 것으로 추측하였으며, 이를 응용하면 적절한 양의 체액을 공급하여 *in vitro*에서 생식세포 배양이 가능할 것으로 사료되었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A living cluster of male spermatogenic cells floating in the coelomic fluid. Spermatids are yet attached in the cluster, the flagella bundle (F) can be seen at the circumferential margin of the cluster (cm). $\times 1,500$
- Fig. 2.** A plastic section of the aggregates and cluster of various developmental stages of spermatogenic cells. The aggregates of spermatogonia (sg) and clusters of spermatocyte (s1, s2) and spermatids(st) can be identified by the shapes of nuclei. $\times 1,500$
- Fig. 3.** At early stage, the coelomic spermatogonia (sg) appear as a single cell with large amount of heterochromatin. Bar: $1 \mu\text{m}$
- Fig. 4.** At late stage of spermatogonia (sg), the cytoplasmic protuberances (cc) begin to extend. In cytoplasm, centriole (arrow), acrosomal rudiment (arrow heads) have been appeared. Bar: $1 \mu\text{m}$
- Fig. 5.** The nuclear matrices of the primary spermatocyte (s1) became more homogeneous comparing with that of previous stages. The acrosomal precursor (A) is appeared to be distinct. Bar: $1 \mu\text{m}$
- Fig. 6.** The cytoplasmic protuberances of the primary spermatocytes (s1) are rather irregularly extended contacting intimately with each other. Bar: $1 \mu\text{m}$
- Fig. 7.** The developments of the primary spermatocytes (s1) in a cluster are largely synchronous, sometimes flagella can be seen at this developmental stage. Bar: $1 \mu\text{m}$
- Fig. 8.** There is a tendency that the secondary spermatocytes (s2) are arranged circumferentially around the cluster or cytoplasmic mass (cm). No indication has been identified that the cytoplasmic mass could be a component of a somatic cell. Bar: $1 \mu\text{m}$. Arrow heads: Cytoplasmic connections
- Fig. 9.** The secondary spermatocytes (s2) with more nuclear vacuoles in number and spermatids(st) in a cluster reveal that the development of spermatogenic cells in a cluster are largely synchronous. Bar: $1 \mu\text{m}$. A: Acrosome
- Fig. 10.** In the cytoplasmic mass, no nucleus of somatic cell has been observed. The acrosomes, flagella and mitochondria are at a final stage in its development. Bar: $1 \mu\text{m}$. cm: Cytoplasmic mass, s2: Secondary spermatocyte, st: Spermatid
- Fig. 11.** The spermatid (st) is yet attached at the cluster by narrow cytoplasmic connection. The vacuoles (V) are commonly appeared at the site between spermatid (st) and cytoplasmic mass (cm). Bar: $1 \mu\text{m}$. M: Mitochondrion
- Fig. 12.** A sperm with a small bits of cytoplasmic components detached from the cluster into the coelomic fluid. Bar: $1 \mu\text{m}$. A: Acrosome, M: Mitochondrion, Ct: Centrioles, F: Flagella





