

U. unicinctus 난자의 인공수정과 감수분열 장치의 회전-이동행위에 관한 편역형광현미경 및 전자현미경적 연구

권혁제, 정진욱, 김완중, 신길상*
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

Immunofluorescence and Electron Microscopic Study on the Artificial Insemination and Rotation-Shift Behaviors of the Bipolar Spindle Fiber in *U. unicinctus* Egg

Hyuk-Jae Kwon, Jin-Wook Jeong, Wan-Jong Kim and Kil-Sang Shin*

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

(Received May 13, 2003; Accepted May 30, 2003)

ABSTRACT

In Vitro fertilization of *U. unicinctus* eggs observed by immunofluorescence and electron microscopes revealed an overview of the meiotic pattern of the tide animals. The eggs have been fertilized early at germinal vesicle stage, followed by germinal vesicle break down (GVBD), but pre mitotic aster like structure could not be resolved by the methods employed in this work.

The meiotic features, such as rotation shift movement of spindle fibers, behavior of spermatozoon monaster in the egg cytoplasm and active spindle fiber of the 1st polar body, have been observed. The anti tubulin FITC fluorescence show the 2nd meiotic apparatus appeared firstly parallel to the tangential line of the oolemma, proceeding the meiosis, its bipolarity is rotated and shifted towards the oolemma. The polar body site of the oolemma was not amorphous, but active in a sense of anti tubulin FITC reactions during the extrusions of the polar bodies.

The immunofluorescence reactions of the spermatozoon centriole appeared at a later stage of the 2nd meiosis. During the time periods, the fertilized spermatozoon resided in the egg cytoplasm. Activating the centrioles, spermatozoon approaches towards the chromosomal materials of the 2nd oocyte. This suggests that spermatozoon centrioles initiate and play a roll to fuse male and female pronuclei.

Key words : Anti tubulin FITC, Bipolar spindle fiber, *In Vitro* fertilization, Meiosis, *Urechis* oocyte

* Correspondence should be addressed to Dr. Kil-Sang Shin, Department of Life Sciences, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Chungnam, Asan 336-745, Korea. Ph.: 041-530-1252, FAX: 041-530-1256, E-mail: Shinks @sch.ac.kr.

서 론

동물 난자 발생과정에서 수정이 가능한 시기와 시점, 즉 개체발생을 전제로 정자를 수용한 후 감수분열을 수행할 수 있는 시기는 종에 따라 어린 난모세포 (young oocyte)기로부터 제1, 2감수분열기의 어느 단계 및 자성전핵기까지 여러 단계로서 매우 다양하다 (Alexander, 1988). 척추동물 난세포의 수정 시기는 제1, 2감수분열이 진행되는 동안의 어느 한 단계이고 무척추 동물에서는 감수분열 전의 어린 난모세포기 및 전핵기까지 연장되는 예가 알려지고 있다 (Schultz, 1967; Masui & Markert, 1971). 수정 시기는 종에 다르지만 수정력을 갖게되면 더 이상의 성숙은 어떤 원인에 의해 억제되므로서 난세포의 수정능력은 상당 기간동안 유지될 수 있는 것이 난세포의 보편적 능력이며 (Kishimoto, 1998; Colas & Dube, 1998; Miwa & Nemoto, 2001), 이는 난세포에서 아직 성장 억제요인이 제거되지 않았거나 혹은 성장 촉진요인 (maturation promoting factor)이 활성화되지 않은 상태로 볼 수도 있다 (Saiki & Hamaguchi, 1997; Kishimoto, 1999).

본 연구의 개불 (*U. uncinatus*) 난세포는 수정으로 인하여 핵이 개방 (germinal vesicle break down, GVBD)되는 현상을 보였으므로, 수정 시기를 germinal vesicle (2n)기인 어린 난모세포기로 볼 수 있는 경우였으며 일부 연체동물 및 환형동물의 예 (Allen, 1953; Finkel & Wolf, 1981; Dube & Guerrier, 1982; Kuriyama et al., 1986)에서만 볼 수 있는 특성을 갖고 있었다. 그러나 수정 후 제1, 2감수분열 장치의 회전-이동 (rotation-shift), 극체 형성시 방추사의 극과 항-튜블린-FITC 활성화 난막과의 복합구조 형성, 정자 monaster의 활성화 시기 등 감수분열 장치의 행위에서는 극피동물에서 볼 수 있는 특성 (Sluder et al., 1989; Hamgauch, 2001; Uetake et al., 2002)을 갖고 있었다. 본 연구에서는 인공 수정한 *U. uncinatus* 난자의 감수분열 과정에 대한 전자현미경 및 형광 공초점현미경 관찰결과를 위 해변동물의 것과 비교 검토하였으며 특히 제1, 2감수분열 장치의 회전-이동 (rotation-shift) 및 극체 형성과정, 그리고 정자 mon-

aster의 행위 및 활성화 시기에 관하여 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 개불 (*U. uncinatus*)은 생식 주기에 서해안 일대의 개펄에서 채집하였다. 이때 개불은 각각 난자, 정자들이 축적되어 색으로 구별이 가능한 난소와 정소를 가지므로 외관상 암수 구별이 가능하였다. 채취한 난소와 정소는 millipore (0.45 μm)로 여과한 자연해수에 여러 번 세척하였다. 수정의 여러 과정은 난자와 정자의 성숙도에 크게 의존하므로 인공수정에는 원칙적으로 각 암, 수 한 개체에서 분리한 정자와 난자만을 사용하였다.

1. 인공수정

채취한 정자와 난자들은 실험에 사용하기 전까지는 각각 정소와 난소에 보관되었으며 이는 각 생식세포의 신선도를 오래 보존하는 필수 요건이었다. 해수와 접촉한 후 정자는 활성을 얻었고, 함입 (indentation) 상태의 난세포막은 구형을 회복하였다. 난세포의 성장은 동시적 (synchronous)이었으나 수정 가능한 직경 100 μm 이상의 난세포를 얻기 위하여 nylon mesh (직경 100 μm)로 여과하였다.

인공수정은 난자:해수 = 1:100로 희석하고, 해수:정자 = 400:1로 희석되도록 조절하였다. 광학현미경으로 수정을 확인한 후 과잉 정자를 제거하기 위해서 해수로 세척하였다. 미수정란을 대조군으로 사용하였으며, 실험군은 수정 직후부터 5분 간격으로 50분까지의 채료를 -20°C 메타노올과 전자현미경 고정액에 고정하였다.

2. 형광염색

실험군의 수정 난세포는 -20°C 메타노올에서 2시간 동안 고정한 후 pH 6.8, PBS (Phosphate buffered saline solution)로 3회 세척하였다. 난외막을 제거하고 anti-tubulin 반응 효율을 높이기 위해서 2~5°C, 2% Triton X-100에서 12시간 처리한 후 PBS로 세척하

였다 (Bestor, 1981). 제1차 항체로는 anti-mouse β -tubulin (Sigma)을 사용하였고 0.1% Triton X-100을 포함하는 PBS와 1:200으로 희석하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 이후 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG로 37°C에서 1시간 처리하여 감수분열 장치를 형광염색하였으며 핵은 알코올에 희석한 propodium iodide 염색하였다. 시료는 glycergel (Dako)에 포매하였고, laser confocal microscope (MRC-1024, Bio-Rad)으로 Kr-Ar dual laser를 이용하여 관찰하였다.

3. 전자현미경 시료제작

미수정란 및 수정란 시료는 인산완충용액 (0.1 M, pH 6.8)으로 희석한 2% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)와 0.5% 글루타르알데히드에 4°C에서 12시간 동안 전고정한 후 동일한 완충액으로 세척하였다. 같은 인산완충용액에 희석된 1%에서 2시간 후고정하였다. 시료를 세척한 후 알코올 농도순으로 각각 15분간 탈수하였으며, propyleneoxide와 Epon 812 (1:1) 혼합물에 12시간 치환하고 포매하였다. 박절편 (1 μ m)은 toluidine blue로 염색하였고, 초박절편 (70~80 nm)은 uranyl acetate와 lead citrate에 염색하여 JEOL 1010B 전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경 관찰

직경 100 μ m 이상의 난세포는 편재성 germinal vesicle (직경 30 μ m) (Fig. 1)을 갖고 있었으며 인공수정 2분 경부터 발달하기 시작한 수정구의 확장으로 10분 경에는 수정막 (14~16 μ m)이 최고로 발달 (Figs. 5, 7)하는 한편, 난세포의 germinal vesicle은 5분 경에 개방 (GVBD)되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 3). 잘 발달한 수정막의 광학현미경적 구조는 방사형 섬유 구조를 포함하는 것으로 보이나 전자현미경 관찰에서는 이를 확인할 수 없었으며 (전자현미경 관찰 참조), 수정 20분과 40분 경에 각각 제1극체와 제2극체가 출현하는 것을 볼 수 있었다 (Figs. 5, 7).

2. 전자현미경 및 형광현미경 관찰

1) Germinal vesicle breakdown (GVBD)

*U. unincinctus*에서 수정에 사용한 난세포는 직경 100 μ m의 어린 난모세포 (young oocyte)였으나 아직 감수분열을 시작하기 전인 germinal vesicle기인 난세포였다.

수정 2분 경에 정자 침체 (500 μ m \times 2 μ m)가 난외막에 부착하고, 정자의 원반형 침체 중앙부에서 돌출한 침체소판 (길이 0.5 μ m)의 막과 난세포 미세융모 막이 융합하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2). 수정막은 다수의 수축형 미세융모를 포함하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 제1극체는 난형 (卵形)으로 상당량의 염색질과 세포질을 포함하는 것으로 보이나 제2극체는 보다 작고 염색질과 세포질의 양이 비교적 빈약한 것으로 보인다 (Figs. 6, 8).

GVBD 직전의 수정란을 공초점 현미경으로 관찰하면 germinal vesicle과 propodium iodide에 염색된 정자를 수정란 세포질에서 볼 수 있었으며, 이로써 난세포가 수정력을 보유하기 시작하는 시기는 germinal vesicle기부터 인 것으로 볼 수 있었다 (Fig. 9). 이때 anti-tubulin-FITC 염색성으로 보아서 정자 monaster의 활성화는 관찰되지 않았거나 혹은 매우 미약한 반면, 난세포의 염색질 (chromatin)은 감수분열 전중기 내지는 중기의 형태적 특징을 보였으며, 난세포 감수분열 장치들이 활성화되는 것으로 관찰되었다. 수정 초기에 난세포 감수분열 장치와 정자의 위치는 서로 대칭인 것으로 볼 수 있었으나 제2감수분열 말기에는 서로 근접하는 것을 볼 수 있었다 (Figs. 9, 10, 11, 12). GVBD 직후로 보이는 시기에 수정란의 감수분열은 전중기에 이르고, 이 시기 혹은 중기에 제1감수분열 장치의 양극성 (bipolarity)은 수정란 세포막의 접선에 대하여 수직이었으며 난막에 근접한 극 (pole)은 난막과 매우 밀접한 구조를 형성하는 것을 볼 수 있었다.

2) 난모세포의 감수분열 장치

대조군인 미수정란에 항-튜블린-FITC (anti-tubulin-FITC)와 propodium iodide를 처리하였으나 실험군에서와 같이 형광 편역반응은 관찰할 수 없었다. 반면, 수정란에서는 초기에 핵막 부근에서, 그리고 감

수분열이 진행됨에 따른 후기에는 난막 부근에서 항-튜블린-FITC와 propodium iodide의 형광색으로 표지되는 양극성 방추사(bipolar spindle fibers) 및 염색질을 관찰할 수 있었다(Figs. 9, 10). 그러나 제1, 2감수분열 장치의 출현과정에는 서로 다른 점이 있는 것으로 보였다. 제1감수분열 초기에 관찰된 양극성 방추사의 극성은 제1난모세포 막의 접선에 대하여 수직이었으며 그 시기는 감수분열 전중기 혹은 중기인 것으로 관찰되었으나(Figs. 10, 11), 제2감수분열 장치의 출현 초기에는 난막에 대하여 평행이었으나 난막을 향하여 이동(shift)하면서 수직으로 회전(rotation)하는 것으로 관찰되었다(Figs. 13, 14). 제1, 2감수분열 장치들은 매우 유사한 장소에서 출현하였고 제1, 2극체 형성 부위, 각 성상체(aster)의 위치, 방향 및 극성, 염색질의 정렬 방향, 그리고 항-튜블린-FITC 활성 난막구조 형성 등에서도 매우 유사하였다.

3) 극체

광학현미경으로 관찰한 극체는 일반적으로 구형이고 제1, 2극체의 크기가 유사한 것으로 보이지만, 전자현미경에서 관찰하면 제1극체($5 \times 10 \mu\text{m}$)는 난원형, 제2극체(직경 $3 \mu\text{m}$)는 구형이며 크기에서도 많은 차이가 있는 것으로 보인다(Figs. 7, 8). *U. uncinatus* 수정란은 수정 40분이 경과한 후 제1, 2극체 등 2개의 극체를 생성하였으나(Fig. 7) 제2극체 형성과 유사한 시기에 제1극체 방추사의 활성이 관찰되었다(Figs. 17, 18, 19). 제1극체 방추사는 항-tubulin-FITC 반응 및 propodium iodide 형광성으로 보아서 상당량의 염색질과 세포질을 포함하는 것을 볼 수 있었으며(Fig. 8), 염색질을 양분할 수 있는 난할구(cytoplasmic furrow)가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와같은 제1극체의 활성은 제2극체와는 상이한 것이었다.

4) 정자 성상체(aster)의 형성

*U. uncinatus*의 난세포 수정에 참여하는 정자는 중심소립 및 중편의 일부를 포함하는 것으로 관찰되었다(Figs. 10, 11, 12). 수정 후 난모세포가 제2감수분열 말기에 이르는 동안 정자에서 활성구조를 관찰할 수는 없었다. 정자의 활성은 제2감수분열 중기, 즉 제2난모세포 염색질이 난모세포막에 근접할 때 시작되

는 것으로 보인다(Fig. 10). 정자의 활성이 보다 명확하게 관찰되는 시기와 장소는 수정 40~50분 후, 즉 제2극체가 형성되는 시기의 난피질부였으며, 정자 중심소립(centriole)로부터 monaster가 발달하였다(Fig. 15). 전핵 융합기로 보이는 시기에는 자성 전핵에서도 monaster와 유사한 성상체 활성을 볼 수 있었다(Fig. 16).

고 찰

인공수정으로 유도한 *U. uncinatus*의 수정단계 및 감수분열 과정은 다음과 같이 요약할 수 있었다. *U. uncinatus*의 난자-정자 최초의 접촉은 정자의 actomere가 난외막으로 돌출한 미세융모의 끝(tip)과 융합하여 이루어지며 이때 정자 침체물질(adhesive material)은 정자를 난외막에 부착토록 하는 부착성 물질(Gould-Somero & Hollander, 1975)인 것으로 보인다. 수정 2분 후 수정구를 형성하였으며 10분에 수정막($14 \sim 16 \mu\text{m}$)이 최고로 발달하였다. 5분 경에는 germinal vesicle이 개방(Germinal vesicle break down, GVBD)되었고 수정란은 감수분열기로 진입하였다. 20분과 40분에 각각 제1, 2극체가 출현하였고 제2감수분열 중기부터 정자 monaster가 활성을 얻는 것으로 보인다. 제2난모세포의 양극성 방추사들은 감수분열 동안 극성의 방향을 회전하고 미래의 자성 전핵을 향하여 이동하는 것을 볼 수 있었으며 이로서 제1감수분열 장치도 rotation-shift하는 것으로 추측할 수 있었다.

U. uncinatus 난세포의 인공수정은 위와 같이 수정 시기, 발생단계 및 단계의 분포, 감수분열시 양극성 방추사의 회전-이동, 극체형성 그리고 정자 monaster의 활성 등에서 포유류(Szollosi et al., 1972; Navara et al., 1994), 척추동물(Gerhart et al., 1989) 및 다른 해변동물(Ishii & Shimizu, 1997; Leutjeans & Dorresteyin, 1998; Saiki & Hamaguchi, 1998; Hamaguchi, 2001)과는 유사한 점과 상이한 점이 있는 것으로 생각하였다.

U. uncinatus 난세포 인공수정에서 볼 수 있는 특성의 하나는 수정 시기와 단계에서 볼 수 있으며 germinal vesicle(2n)은 수정 → GVBD → 제1, 2감수분

열 및 성숙→전핵 융합의 단계를 거치므로서 난자형성 단계의 이른 시기에 수정력을 갖는 것이었다. 이는 동물계의 많은 예에서 보는 GVBD→제1감수분열 전기 내지는 제2감수분열 중기(감수분열 성숙)→수정→전핵융합의 과정을 거치는 것(Russo et al., 1998)과 비교할 때 수정시기 및 수정력 보유 단계에서 차이가 있는 것으로 생각할 수 있었다. 후자를 포함하여 전핵 형성기에 수정되는 동물(sea urchin, coelenterate, Brachet, 1991)은 최종 성숙단계에서 얻을 수 있는 활성화에 의해 수정이 가능하며(Stricker, 1999), 이 수정력이 상당기간 동안 유지되는 것은 어떤 요인에 의해 더 이상의 성숙이 억제되기 때문이다(Masui & Markert, 1971; Kishimoto, 1998; Colas & Dube, 1998; Russo et al., 1998; Miwa & Nemoto, 2001). 밝혀진 예에서 보면 수정으로 인하여 감수분열 성숙(meiotic maturation) 또는 감수분열이 가능한 것은 정자의 침입 혹은 유입으로 인하여 성숙억제요인이 제거되거나 난세포질에 포함된 MPF(maturation promoting factor)가 활성화된 결과로 볼 수 있다(Segata, 1996; Whitake, 1996; Taieb et al., 1997). 난세포의 성숙 억제요인 제거 또는 MPF의 재활성화 시기 및 가능성을 수정력으로 볼 때, *U. unincinctus* 난자가 감수분열 전인 2n 상태의 germinal vesicle (100 μ m)기에 수정할 수 있다는 것으로서 수정력 보유시간이 오랫동안 지속될 수 있는 것으로 볼 수 있었다.

U. unincinctus 난세포는 수정 후 핵이 개방되고 감수분열이 수행되었으므로 감수분열 장치가 정자에서 공급되는 것으로 추측되기도 하였으나 실험 결과를 보면 감수분열 장치의 기원은 정자와 무관다는 것을 알 수 있다. 이는 수정 시기는 다르지만 감수분열이 진행되는 동안에 수정되는 많은 동물의 예에서 보는 바와 같은 것으로 볼 수 있는 결과였다. 감수분열 중에 수정되는 다른 동물의 예에서는 수정 전의 난세포에 pre-mitotic aster와 같은 세포분열 장치가 형성되며, 따라서 감수분열 장치는 난세포 기원인 것이 밝혀진 바 있다(Miyazaki et al., 2000; Uetake et al., 2002). *Urechis*의 다른 종인 *U. bonellia*에서도 수정시기가 제1난모세포기인 것으로 보고된 것(Leutert, 1974)과, 포유류의 일부에서 난세포 성숙 후 여러 단

계에서 수정이 가능한 것도 위와 같은 난세포 기원의 pre-mitotic aster가 존재하기 때문인 것으로 생각할 수 있다(Lopata et al., 1988). *U. unincinctus*의 난세포는 수정된 이후에 핵이 개방되었고 이어서 감수분열이 진행된다는 표면적 사실로만 보면 감수분열 장치가 정자에서 공급되는 것으로 추측할 수도 있다. 그러나 수정된 정자의 항-튜블린 및 propodium iodide 반응 결과를 보면 적어도 제2감수분열 중기까지 정자와 정자 중심소립이 불활성인 것으로 관찰되므로서 감수분열 장치는 난세포 기원인 것으로 볼 수 있었다. 한편, 미수정란에 처리한 항-튜블린-FITC 형광반응에서 pre-mitotic aster의 존재를 밝힐 수는 없었다. 본 연구의 결과로는 감수분열 전에 수정된다 해도 감수분열 장치는 난세포 기원인 것으로 생각되는 한편, pre-mitotic aster와 유사한 구조의 존재 여부를 밝히기 위해서는 보다 성숙한 난세포를 사용해야 할 필요가 있다고 사료되었다.

자용전핵 융합을 주도하는 세포분열 장치는 *U. unincinctus*에서 제2감수분열 중기 이후에 활성을 얻는 정자 유래의 방추사인 것으로 관찰된 바 있다. *U. unincinctus*에서 보면 난자의 제2감수분열 중기에 정자의 세포분열 장치인 monaster가 활성을 얻는다는 증거가 있고 제2난모세포의 감수분열 장치에서는 성상체보다는 방추사가 발달한 것으로 관찰된 바 있었다. 난모세포가 제1, 2감수분열을 거치는 동안 정자 핵은 미래의 자성 전핵을 향해서 이동하여 서로 근접하였으며 그 시기는 수정 40분 경인 것으로 관찰된 바 있다. 따라서 *U. unincinctus* 정자는 난모세포질에 유입 혹은 침입한 후 수정 40분 경인 제2감수분열 중기 이후에 활성을 얻고 전핵 융합을 주도하는 것으로 생각할 수 있었다.

본 연구의 관찰 결과로 보면 생성 위치, 정렬방향, 이동 및 행위 등에서 제1, 2감수분열 장치사이에 유사점과 상이점들이 관찰된 바 있다. 이들 사이에 유사점들은 첫째, 핵막에 근접한 난모세포 피질부에서 생성되고, 둘째, 극체 형성시 항-튜블린-FITC 활성 난막과 물리적 접촉을 추측케하는 구조를 형성하였다는 것과 셋째, 방추사와는 달리 성상체(aster)의 발달은 미약하였다는 것이었다. 서로 다른 점들은 이들의 생성 초기 정렬방향과 난막을 향하여 이동할 때

의 행위로서 제1방추사의 양극성은 초기에 난모세포 막의 접선에 대하여 수직으로 생성된 반면 제2방추사의 극성은 난모세포 막에 대하여 평행이라는 점이 었다. 난모세포 막에 평행인 제2방추사의 극성은 난 막에 접근하면서 수직으로 변화하였으므로 이동하는 동안 회전(rotation-shift)하여 수직으로 정렬한 후 한 쪽 극이 난모세포막과 접촉하였다. 이는 제1방추사 양극성이 위에 열거한 여러 가지 특성으로 볼 때 제1방추사 생성 초기과정이 관찰되었다면 제2감수분열 장치와 같이 이동하는 동안 회전하는 특성이 있을 것으로 추측할 수 있는 결과였다. 위에서와 같이 *U. uncinatus* 방추사들의 정렬방향 및 shift-rotation하는 현상은 불가사리의 것(Sluder et al., 1989; Hamgauich, 2001; Uetake et al., 2002)과 비교할 수 있었고 생성 장소에서는 연체동물의 것(Kumiyama et al., 1986)과 비교할 수 있었으나 방추사의 극(pole)과 난모세포 막성구조의 접촉 혹은 접촉 구조에 대하여는 아직 자세히 알려지지 않고 있다. 한편, 제2극체와는 달리 제1극체의 방추사는 난모세포의 제2감수분열시 연체 동물에서 볼 수 있는 것과 같이 활성화(Kuriyama et al., 1986)이 있는 것으로 보이며, 이는 난할 형식(cleavage pattern)에 대한 연구에서 3개의 극체를 보고한 바(Shin, 1992)와 일치하는 결과로 인식할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Alexander NJ: The fertilization of human oocytes at different stages of meiotic maturation. In "In vitro Fertilization" pp. 324, Howard W, Jones Jr. ed. Annals of the New York Academy of Science. 541, 1988.
- Allen RD: Fertilization and artificial activation in the egg of surf clam *Spisula solidissima*. Biol Bull 105 : 213-239, 1953.
- Bestor TH, Schatten G: Anti tubulin immunofluorescence microscopy of microtubules present during the pronuclear movements of sea urchin Fertilization. Dev Biol 88 : 80-91, 1981.
- Brachet J: Oogenesis. In "Developmental biology". pp. 55, Browder LW, ed, 3rd ed. Saunder College Publishing 1991.
- Colas P, Dube F: Meiotic maturation in mollusc oocytes. Semin. Cell & Dev Biol 9 : 539-548, 1998.
- Dube F, Guerrier P: Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes by sperm or KCl, but not by NH₄Cl, requires a calcium influx. Dev Biol 92 : 408-417, 1982.
- Finkel T, Wolf DP: Membrane potential, pH and the activation of surf clam oocytes. Gamete Res 3 : 299-304, 1981.
- Gerhart J, Danilchik M, Doniach T, Robert S, Bowning B, Stewart R: Cortical rotation of the *Xenopus* egg: Consequence for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. Development : 37-51, 1989 (suppl.).
- Gould Somero M, Holland L: Fine structural investigation of the insemination response in *Urechis caupo*. Dev Biol 46 : 358-369, 1975.
- Hamaguchi Y: Displacement of the mitotic apparatus which induces ectopic polar body formation or parthenogenetic cleavage in the starfish oocytes. Dev Biol 364 : 364-375, 2001.
- Ishii R, Shimizu T: Equalization of unequal first cleavage in the Tubiex egg by introduction of an additional centrosome: Implications for the absence of cortical mechanisms for mitotic spindle asymmetry. Dev Biol 189 : 49-56, 1997.
- Kishimoto T: Cell cycle arrest and release in starfish oocytes and eggs. Semin. Cell & Dev Biol 9 : 549-557, 1998.
- Kishimoto T: Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. Dev Biol 214 : 1-8, 1999.
- Kuriyama R, Borisy GG, Masui Y: Microtubule cycles in oocytes of the Surf clam, *Spisula solidissima*: An immunofluorescence study. Dev Biol 114 : 151-160, 1986.
- Leutert TR: Zur geschlechtsbestimmung und gametogenese von *Bonellia vividis*. Rolando. J Embryo Exp Morphol 32 : 169-193, 1974.
- Leutijens CM, Dorresteyn AWC: Dynamic changes of the microtubule system corresponding to the unequal and spiral cleavage modes in the embryo of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Bivalvia). Zygote 6 : 239-248, 1998.
- Lopata A, Leung PC: The fertilization of human oocytes at different stages of meiotic maturation. In "In vitro Fertilization" pp. 324, Howard W Jones Jr. ed. Annals of the New York Academy of Science. 541, 1988.
- Masui Y, Markert CL: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J Exp Zool 19 : 129-146, 1971.

- Miwa T, Nemoto SI: Reproductive maternal centrosomes are cast off into polar body during maturation division in starfish oocytes. *Exp Cell Res* 269 : 130-139, 2001.
- Miyazaki A, Kamitsubo E, Nemoto SI: Premeiotic aster as a device to anchor the germinal vesicle to the cell surface of the presumptive animal pole in star fish oocytes. *Dev Biol* 218 : 161-171, 2000.
- Navara CS, First NL, Schatten G: Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: The role of the sperm aster. *Dev Biol* 29 : 40, 1994.
- Russo GL, Wilding M, Marino M, Dale B: Ins and outs of meiosis in ascidians. *Sem Cell & Dev Biol* 9 : 559-567, 1998.
- Saiki T, Hamaguchi Y: Division of polar bodies induced by their enlargement in the starfish *Asterina pectinifera*. *Exp Cell Res* 237 : 142-148, 1997.
- Saiki T, Hamaguchi Y: Aster forming ability of the egg, polar body, and sperm centrosomes in early starfish development. *Dev Biol* 203 : 62-74, 1998.
- Schultz AW: Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J Exp Zool* 166 : 347-354, 1967.
- Segata N: Meiotic metaphase arrest in animals oocytes : its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol* 6 : 22-28, 1996.
- Shin KS: Artificial insemination of *Urechis unicinctus* oocyte I : Development of ciliated blastula. *J Soonchunhyang Univ* 15 : 889-897, 1992. (Korean).
- Sluder G, Miller FJ, Lewis K, Davison ED, Rider CL: Centrosome inheritance in starfish zygote : selective loss of the maternal centrosome after fertilization. *Dev Biol* 131 : 567-579, 1989.
- Stricker SA: Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 211 : 157-176, 1999.
- Szollosi D, Calarco P, Donahue RP: Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocyte. *J Cell Sci* 11: 521-541, 1972.
- Taieb F, Thibie C, Jessus C: On cyclins, oocytes, and egg. *Mol Repro Dev* 48 : 397-411, 1997.
- Uetake Y, Kato KH, Setsuko WN, Nemoto SN: Nonequivalence of maternal centrosomes/centrioles in the starfish oocytes : selective casting off of reproductive centrioles into polar bodies. *Dev Biol* 247 : 149-164, 2002.
- Whitaker M: Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1 : 127-135, 1996.

< 국문초록 >

U. unicinctus 난세포를 인공수정 한 결과 수정 시기는 germinal vesicle (2n)기였으며 정자 중앙부에서 돌출한 actomere와 난모세포의 미세용모 끝에서 세포막 융합이 시작되는 것으로 관찰되었다. Germinal vesicle기에 수정이 가능하였으므로 pre mitotic spindle이 관찰되지 않은 것으로 사료되었다. 수정 후 난모세포는 제1, 2감수분열을 수행하였으며 각각의 감수분열 장치들은 감수분열 말기에 난모세포막과 밀접한 구조를 형성하였고, 이 부위에서 극체가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 극체 형성 시 난모세포막은 세포분열의 관점에서 형태가 없는 것이 아니라 항 튜블린 FITC에 대한 활성구조를 형성하였으며, 각 감수분열 장치의 한쪽 극(pole)과 어떤 복합 구조를 형성하는 것으로 보인다. 제2극체 형성도 제1극체와 유사한 방법으로 형성되었으나, 제2감수분열 장치는 난모세포막의 접선에 평행하게 생성된 후 세포막을 향해 이동하면서 방추사의 양극성이 회전(shift rotation)하였고 접선에 수직으로 정렬하는 것을 볼 수 있었다. 난모세포의 감수분열 장치에서 방추사의 활성화는 강하였으나 aster의 활성화는 비교적 약한 것으로 보였다. 제2감수분열이 진행되는 동안 난모세포질에 머물고 있던 정자는 점차 미래의 자성 전핵 형성부인 난모세포막 근접부로 이동하는 것이 관찰되었다. 난모세포막 근접부로 이동하는 동안 정자 aster의 활성화는 점차 강해지는 반면 난모세포의 aster에서는 활성화가 미약한 것으로 보아서 자성 전핵융합을 주도하는 것은 정자 유래의 aster인 것으로 사료되었다. 제1난모세포의 감수분열 장치가 활성화되는 시기에 제1극체의 방추사에서도 강한 활성을 관찰할 수 있었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** The germinal vesicle (GV) stage of *U. uncinatus* egg. The full grown nucleus is slightly eccentric in its position. $\times 400$.
- Fig. 2.** Actomere (A) fuse with the tip of microvillus (Arrow), while acrosomal adhesive materials contact with the egg extra-envelope. Bar: $1\ \mu\text{m}$, C: Cortical granule, N: Sperm nucleus, S: Egg surface coat.
- Fig. 3.** The full grown fertilization envelope (F) and the germinal vesicle break down (GVBD) occur after 10 min. of fertilization. $\times 400$. R: Radial arrays.
- Fig. 4.** Radial arrays in the fertilization envelope of fig. 3 have been revealed in this electron micrograph as a retracted form of microvilli (M). Bar: $2\ \mu\text{m}$, Cy: Egg cytoplasm.
- Fig. 5.** The 1st polar body (P) appear at 20 minutes after fertilization. Bar: $2\ \mu\text{m}$, Ps: Perivitelline space.
- Fig. 6.** The 1st polar body (P) contains a large amount of cytoplasm and chromosomal materials (Ch). Bar: $2\ \mu\text{m}$, Ps: Perivitelline space.
- Fig. 7.** Two polar bodies can be seen at 40 minutes after artificial insemination. $\times 400$. F: Fertilization membrane, P1: The first polar body, P2: The second polar body.
- Fig. 8.** The 1st (P1) and 2nd polar bodies (P2) are different in its size and cytoplasmic contents. The 1st larger polar body exhibit meiotic apparatuses during the time period of 2nd meiosis. Bar: $2\ \mu\text{m}$, Ch: Chromosome, M: Microvilli.
- Fig. 9.** The fertilized spermatozoon (Arrow) in the egg cytoplasm can be identified by fluorescence at near the nuclear envelope. $\times 400$. GV: Germinal vesicle.
- Fig. 10.** The fertilized spermatozoon (Sp) resides in the egg-cytoplasm during the meiosis. $\times 400$. Arrows: The 1st meiotic apparatus.
- Fig. 11.** The 1st meiotic set of chromosome aligned at near of oolemma, and bipolarity of spindle fibers aligned perpendicularly to tangential line of the oolemma. $\times 400$. Sp: Spermatozoon, Arrows: Metaphase spindle of the 1st meiosis.
- Fig. 12.** At the end of the 1st meiotic anaphase, one set of chromosome begin to protrude the oolemma. The spermatozoon (Sp) appear to be approached gradually to the oocyte chromosome. $\times 400$. Arrow: Telophase spindle of the 1st meiosis.
- Fig. 13.** The 2nd meiotic spindle fibers (Bp2) and its bipolarity aligned firstly parallel, but lately rotate-shift perpendicularly to the tangential line of the oolemma (fig. 14). $\times 400$.
- Fig. 14.** One pole of the 2nd meiotic apparatus (Bp2) approaches perpendicularly to oolemma. P1: The 1st polar body.
- Fig. 15.** The monaster of the spermatozoon (Sa) at the margin of egg cytoplasm begin to activate at the end metaphase of the 2nd meiosis. And the Egg-aster (Ea) exhibits a relative weak activities. $\times 400$.
- Fig. 16.** Spindle fibers of spermatozoon and egg approach each other in this median view of fertilized egg. $\times 400$. Arrows: Pronuclei fusion-site.
- Fig. 17.** The immunofluorescences at metaphase of the 1st meiosis have been revealed intimate structural associations between oolemma and one pole of meiotic apparatus. $\times 400$. Bp2: Bipolar spindle of the 2nd meiosis, P1: The 1st polar body.
- Fig. 18.** The Chromosomal sets (Sc) of the 1st polar body begin to separate by cytoplasmic furrow (Arrow). $\times 400$
- Fig. 19.** The meiotic apparatus of the 1st polar body (P1) appears active during the 2nd meiosis of the oocyte. $\times 400$.







