

인공수정에 의한 *Urechis unicinctus* 난자의 난할형식

신길상*, 이대희, 고태영
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

Cleavage Pattern of *Urechis unicinctus* Eggs in *Vitro* Fertilization

Kil-Sang Shin*, Dae-Hee Lee and Tae-Young Ko

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

(Received February 18, 2004; Accepted March 5, 2004)

ABSTRACT

When *U. unicinctus* mature oocytes were fertilized *in vitro*, germinal vesicle breakdown (GVBD) and meiosis occurred and the zygotes entered cleavage stage. A modified pattern of spiral cleavages, suggestively based on behavior of mitotic spindles, have been observed in this work.

The first and second cleavages were meridional and the third was equatorial, and then followed by repetitions of meridional-equatorial cleavage. The cleavage of the isolecithal egg were equal and holoblastic and its patterns were spiral. The anti- α , β tubulin reactions and confocal microscopy revealed mitotic apparatus tilted obliquely at each mitosis causing oblique displacements of the blastomeres. Despite isolecithal distribution of yolk, this observations implicated that tilting of mitotic apparatus induced spiral cleavage and the displacements of blastomeres. However, these features would not be the typical spiral cleavage, but represented a modified pattern of known *Spiralican's* in the sense of the equal cleavage.

During the first cleavage, heart-shaped eggs have been produced. Electron microscopies exhibited the first cleavage furrow extended with its membranous structure deeply into the cytoplasm. Contractile ring has not been observed.

Key words : Anti- α , β tubulin, *In Vitro* fertilization, spiral cleavage, *Urechis* oocyte,

서론

*U. unicinctus*의 생식세포는 해당 계절에 각각의 생

식소에 축적되므로 localized gametogenesis를 수행하는 한편, 성숙 생식세포들은 체액에서 자유세포로 분리될 수도 있어서 diffuse gametogenesis 혹은 solitary gametogenesis를 수행하는 것으로 볼 수도 있다

본 연구과제는 2003년도 순천향대학교 학술연구조성비 특성화공모과제로 지원을 받아 수행하였음.

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

Copyright © 2004 Korean Society of Electron Microscopy

(Shin, 1986; Choe et al., 1988). 이러한 *U. uncinatus* 생식세포 형성과정의 특성은 수정, 감수분열 및 난할 등 일련의 발생과정과 연관되고 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측할 수 있었다. 이 특성 중에서 난모세포기인 germinal vesicle (2n) 시기에 이루어지는 수정과 핵 개방(germinal vesicle breakdown; GVBD) 및 그 후 감수분열 기구의 행위에 관한 것은 보고된 바 있으나 (Kwon et al., 2003), 난할과정에 관한 것은 아직 찾아볼 수 없었다.

U. uncinatus 성숙란의 수정시기는 위 보고와 같이 난모세포기인 germinal vesicle (2n)로서 일부 연체동물 및 환형동물에서만 볼 수 있는 특성을 갖고 있었으며 (Finkel & Wolf, 1981; Dube & Guerrier, 1982), 난모세포기부터 전핵기까지 동물에 따라 상이한 무척추 동물 (Schultz, 1967; Masui & Markert, 1971; Alexander, 1988) 중에서도 이른 편인 것으로 볼 수 있었다. 그러나 *U. uncinatus* 수정란에서 제1, 2감수분열 기구들이 회전-이동(rotation-shift)하는 현상이 관찰된 것은 극피동물의 성계 및 불가사리 등에서 밝혀진 것과 매우 유사한 것으로 관찰된 바 있다 (Sluder, et al., 1989; Hamaguchi, 2001; Uetake et al., 2002). 이로서 *U. uncinatus*의 수정시기와 감수분열에 관한 여러 가지 현상들이 환형동물뿐만 아니라 극피동물과도 같지 않다는 것을 의미한다고 생각할 수 있었다.

이러한 배경에서 *U. uncinatus* 인공 수정란의 난할 과정에서 보면, 위에 기술한 바와 유사한 것과 상이한 현상들이 관찰된 바 있다. 난할형식은 원칙에서 환형동물의 나선형 난할(Freeman & Lundelius, 1982)과 유사하였으나, 제1차 난할에서는 성계 등 극피동물에서 볼 수 있는 심장형 수정란(heart-shaped egg)이 형성되었고, 적어도 16세포기까지는 등할(equal cleavage)과 전할(holoblastic cleavage)을 수행한다는 점에서는 나선형 난할의 전형이라고는 볼 수 없었다. *U. uncinatus* 수정란에서 나선형 난할의 특징은, 식물극 할구들과 동물극 할구의 배열이 사선방향으로 배열한 8세포기에서 볼 수 있었다. 난할기의 유사분열 기구를 항- α -, β -튜불린으로 처리하고, 이를 항-튜불린-FITC로 표지한 결과에서는 유사분열 기구의 선회성이 관찰되었으므로, 위 난할의 특성이 유사분열 기구의 행위에 원인이 있을 것으로 추측할 수 있었다. *Urechis*

의 다른 종인 *U. caupo*의 난할형식이 4세포기의 할구 배열상태를 근거로 나선형 난할(spiral cleavage)인 것으로 보고된 바(Gould-Somero, 1975; Newby, 1986) 있으나 본 연구에서는 *U. uncinatus* 수정란에서 관찰되는 일련의 나선형 난할과정과 단계를 유사분열 기구의 행위와 연관하여 서술하는 한편, 적어도 16세포기까지는 등할, 전할한다는 사실을 밝히므로서, 이 동물의 난할형식이 나선형 난할의 전형에서 벗어난다는 것을 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 인공수정

본 실험에 사용한 개불(*U. uncinatus*)은 생식 주기에 서해안 일대의 개펄에서 채집하였다. 채취한 정자와 난자들이 실험에 사용하기 전까지는 각각 정소와 난소에 보관되었고, 인공수정의 여러 과정은 난자와 정자의 성숙도에 크게 의존하므로 수정과정에는 원칙적으로 각 암수 한 개체에서 분리한 정자와 난자만을 사용하였다.

자연해수 (염분도 20‰, pH 8.1)는 millipore (0.45 μm)로 여과하였으며 발생 기간동안 해수의 온도는 16~18°C로 유지하였다. 성숙 난자는 나일론 망(nylon mesh; 직경 100 μm)로 여과하여 선별하였고 인공수정은 난자:해수=1:100으로 희석하고, 해수:정자=400:1로 희석되도록 조절하였다. 인공수정 후 수정란에서 최초의 변화는 수정구의 출현이었으므로 이를 광학현미경으로 확인한 후 과잉 정자를 제거하였다. 미수정란을 대조군으로 사용하였으며, 실험군은 수정 직후부터 초기에는 5분 간격으로, 그 후에는 임의의 시간에 재료를 -20°C 메타노올(methanol)에 고정하여 편역형광현미경 관찰에 사용하였고 전자현미경 관찰을 위한 재료는 아래와 같이 별도로 고정하였다.

2. 형광현미경 및 전자현미경 관찰

편역형광반응을 위한 수정란은 -20°C 메타노올(methanol)에서 2시간 동안 고정한 후, pH 6.8, 인산완충용액(PBS; Kuriyama et al., 1986)로 3회 세척하였다.

때로 유사분열 장치를 관찰하기 위한 재료는 항체의 반응 효율을 위해서 2~5°C, 2% Triton X-100에서 12시간 처리하여 수정막을 제거한 후 PBS로 세척하였다(Bestor, 1981). 제1차 항체는 monoclonal anti-mouse- α -, β -tubulin IgG1 isotype (Sigma)을 사용하였고 PBS와 1:200으로 희석하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 일차 항체를 goat anti-mouse IgG-FITC로 37°C, 습기상자에서 1시간 처리하여 유사분열 장치를 형광 염색하였다. 시료는 glycergel (Dako)에 포매한 후, 레이저 공초점 현미경(MRC-1024, Bio-Rad)으로 Kr-Ar dual laser를 사용하여 관찰하였다.

난할구(cleavage furrow)를 전자현미경으로 관찰하기 위해서는 다음과 같은 방법을 사용하였다. 수정란을 0.1M 인산완충용액(0.1M, pH 6.8)으로 제조한 2% 파라포름알데히드(parformaldehyde)와 0.5% 글루타르알데히드 혼합액에 고정된 후, 미세조작기를 이용하여 제1차 난할 중인 난자를 선별하였고, 동일 고정액으로 4°C에서 12시간 동안 전고정한 후 같은 완충용액으로 수회 세척하였다. 동일 인산완충용액에 희석된 1% OsO₄에서 2시간 동안 후고정을 하였다. 시료를 세척한 후 알코올을 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 80kV에서 관찰하였다

결 과

1. 광학현미경 및 형광현미경 관찰

1) 수정란

*U. unicinctus*의 체액에서 분리한 난자의 형태는 구형(130~150 μ m in diam.)이었으나 난소에서 분리한 난자는 난막의 함입(indentation)과 핵막 함입부(invagination)을 갖는 것이 다수였다(Fig. 1). 난소에서 분리한 난자는 그러나 해수와 접촉하거나 수정되면 구형을 회복하였고, 이후 체액에서 분리한 난자와 구별할 수 없었다. 성숙란은 등황란이나, germinal vesicle (2n,

50 μ m)은 약한 편재성을 가지므로 동물극과 식물극을 구별하는 것이 가능하였다(Fig. 2). 인공수정 후의 여러 현상은 사용하는 온도에 영향 받는 것으로 보였으며, 본 연구에서 적용한 여러 가지 조건에서는 수정 2~3분경에 수정구가 출현하였고, 수정 15분에 핵 개방(germinal vesicle breakdown; GVBD)이 시작되었으며, 이때 수정막이 최고로 발달하는 것(14~16 μ m)것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 그 구조에 있어서 수정막은 무형이 아니었으며 방사형 섬유 구조를 포함하는 것으로 관찰되었고, 외곽에 수많은 과잉 정자들이 부착하는 것을 볼 수 있었다. 수정 40분에 제1극체가 출현하였고(Fig. 4), 90분에는 제2극체가 제1극체와 유사한 장소에서 출현하였다(Fig. 5). 제2극체 생성될 때, 제1극체도 감수분열하는 증거가 있으므로 극체의 총수는 3개인 것으로 보였다. GVBD 이후에는 동물극과 식물극을 구별되지 않았으나 곧 1극체가 출현하였고, 이에 대응하는 반구(hemisphere)로부터 난할구가 발생하였으므로, 난할구 발생이 시작되는 반구가 동물극, 그리고 극체가 돌출하는 식물극인 것으로 구별할 수 있었다(Figs. 6, 7).

2) 2세포기

제1차 난할은 동물극과 식물극을 잇는 난축을 따라 진행되는 경할(meridional)이었고, 결과는 동일한 크기의 2개 할구(120×85 μ m)가 생산되었으므로 등할(equal cleavage)이었으며 전할(holoblastic cleavage)이었다. 제1차 난할의 중간단계에서 심장형 수정란(heart-shaped egg)이 형성되었으며(Fig. 7), 심장형 수정란 형성 초기에 미래의 난할구 부위인 동물극에 cleavage streak이 생기는 것을 광학현미경으로 관찰할 수 있었다(Fig. 6). Cleavage streak이 식물극을 향하여 신장됨에 따라, 난할구(cleavage furrow)가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 동물극에서 난할구의 함입이 시작하는 시기에 식물극은 약하게 돌출하였으며, 돌출부는 극체 근접부인 것을 볼 수 있었고, 이로서 위와 같은 심장형 수정란이 형성되는 것을 볼 수 있었다. 이때 수정란의 동물극-식물극 사이의 거리는 감소하였고 미래의 할구와 할구사이는 다소 길어지는 현상을 명확하게 볼 수 있었다(Figs. 8, 9). 식물극에서 난할이 시작되었을 때, 미래의 할구사이에 대칭성이 회복되는 것

을 볼 수 있었다. 광학현미경 관찰에서는 이때 전 단계와는 달리 미래의 2할구 사이에 마치 음압이 걸리는 것과 같이 막성 구조만으로 연결되고 세포질이 희박한 할구와 할구사이의 간격을 볼 수 있었다(Fig. 9). 이 음압 구조에서 수축환(contractile ring)을 관찰할 수 있을 것으로 보였으나 전자현미경 관찰에는 이를 확인할 수 없었다(Figs. 25, 26).

항- α -, β -튜블린 표지와 형광현미경 관찰 결과에서는 GVBD 직전 핵막과 난세포막 사이에 항- α -, β -튜블린에 반응하는 성장체 미세소관(astral microtubules)이 핵과 난피질을 연결하는 것으로 보였으나(Fig. 19), 이후에는 극체가 출현하는 식물극 난막부위에서 보다 강한 성장체 미세소관의 반응성이 관찰되었다(Fig. 20). 방추사는 동물극-식물극 축에 대하여 직각으로 배열한 것을 볼 수 있었다. 동물극에서 관찰할 때, 2세포기의 방추사는 수정란에서와 같이 동-식물극 축에 직각으로 발생하는 것으로 보인다(Fig. 21). 각 할구의 방추사는 넓이가 $7.5\mu\text{m}$ 인 것이 보통이었고 높은 활성을 갖는 것으로 보였으나 때로 $2.5\mu\text{m}$ 인 경우도 관찰되었다(Figs. 21, 22). 활성 방추사는 때로 동-식물극 면에 평행 배열하지 않고 형성 초기와는 달리 좌, 우회전에 의해 일정한 각도를 형성하는 것으로 볼 수 있었다. 본 연구에서 2 → 4세포기에 보이는 유사분열 기구의 좌선성 혹은 우선성 여부는 확실하지 않았으나, 동일한 현상을 4 → 8세포기를 관찰하면 좌선성이라는 것을 볼 수 있어서, 2 → 4세포기의 선회성은 우선성으로 볼 수 있었다.

3) 4세포기

광학현미경 관찰에서는 제2차 난할이 경할인지 혹은 수평할(equatorial cleavage)인지를 알 수 없으나 Figs. 22에서 보는 바와 같이 제2차 유사분열 장치는 제1차 난할구와 평행하게 배열한 것이 관찰되었으므로, 제2차 난할도 경할임을 볼 수 있었다(Fig. 10). 제2차 난할 결과에서 동일한 크기의 4개 할구(직경 $75\mu\text{m}$)를 생산하므로(Figs. 10-12), 등할, 전할인 것을 볼 수 있었으며, 4세포기에 이르면 난할 직후의 할구 배열(Fig. 11)과 시간이 다소 경과한 후의 할구 배열(Fig. 12)이 상이한 것을 볼 수 있었다. 이 할구의 배열을 동물극에서 보면 4개의 할구가 한 평면에 있지 않

고 일부 할구들이 다른 할구보다 위쪽으로 융기한 것과 같이 보였다(Figs. 12, 23). 이로서 제2차 난할 후 시간이 경과하면, 난할 직후의 할구 배열에서 약간의 좌측 혹은 우측 기울림이 있는 것으로 보였다. 4세포기에서 8세포기에 이르는 시간은 인공수정에서 조절했던 해수의 온도에 따라 다소 차이는 있을 수 있으나 약 20분이 소요되었다.

4세포기의 유사분열 기구의 배열은 생성시와 실제 난할시의 배열이 상이한 것으로 관찰되었고, 이는 위의 4할구 배열과 관련되는 것으로 볼 수 있었다. 4세포기의 유사분열 기구가 출현 할 때는 동-식물극 축에 대하여 직각으로, 그리고 각 대응 할구에서는 서로 평행하게 출현하였으나(Fig. 23), 난할시에는 유사분열 기구들이 동-식물극 축에 대하여 사선 배열하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 24). 이 유사분열 기구의 선회 정도를 본 연구에서는 확인 할 수 없었으나 8세포기의 할구배열로 보아서 45° 내외인 것으로 추측할 수 있었다. 이 유사분열 기구의 최종 배열로서 제3차 난할은 수평할이 가능할 것으로 보았으며, 이때 유사분열 기구의 한쪽 극이 식물극을 향하는 방향이 좌측이었으므로 미래의 할구 배열은 좌선성임을 볼 수 있었다.

4) 8세포기

제3차 난할은 4세포기의 유사분열 기구의 배열로 보아서 수평할(equatorial cleavage), 그리고 크기가 유사한 8개 할구($60\mu\text{m}$ in diam.)가 생산되었으므로 등할, 전할이 반복되는 것으로 볼 수 있었다. 8세포기의 할구배열은 식물극에 4개, 그리고 동물극에 4개 할구가 배열하고 있으나, 식물극-동물극의 대응 반구의 할구들이 서로 사선 방향으로 배열하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 13).

8세포기의 난할, 즉 4차 난할 결과로서 유사한 크기의 할구들이 생산되는 것으로 보아서 등할인 것을 관찰할 수는 있었으나(Fig. 14), 경할 혹은 수평할의 여부는 관찰이 어려웠다. 16세포기 이후 포배(blastula) 단계의 할구는 크기에서 다소 차이가 있는 것으로 보이나, 이는 난할시기의 차이로 인한 것이며 할구들이 부등할한 결과로는 볼 수 없었으며, 부등할에서 볼 수 있는 대할구, 중할구, 소할구 등을 관찰할 수는 없었다(Fig. 15). 이후의 배(embryo)는 섬모 포배기(ciliated

blastula; Fig. 16)를 거쳐 부화하고(Fig. 17), 유생기(trochophore larvae; Fig. 18)에 이르는 것으로 관찰되었다.

2. 전자현미경 관찰

광학현미경 결과에서 심장형 난할구가 관찰된 바 있었고 Fig. 8과 같이 제1차 난할에서 세포질 분열이 실질에서 종료 단계에 있음에도 난세포막의 분열이 완성되지 않은 중간 단계가 관찰되었으므로 수축환이 존재할 수 있을 것으로 보였다. 이를 전자현미경으로 관찰한 결과 불연속적인 막성 소포구조들이 할구 사이를 경계짓고 있음을 볼 수 있었다(Figs. 25, 26). Fig. 25는 Fig. 7과 같이 난할구 생성 단계에서 볼 수 있는 동물극 난할구에 대한 다수의 전자현미경 관찰 결과를 모자이크(mosaic)한 것이며 Fig. 26은 Fig. 9에서 볼 수 있는 중간단계 전체를 모자이크하고 이를 그림으로 재구성한 것이다.

제1차 난할중인 수정란에서 동물극은 난할구의 세포막으로 두 개의 할구가 분리되었으나 세포질의 중앙과 식물극은 아직 분리되지 않은 심장형 수정란을 보면(Fig. 25), 세포질쪽에서 난황물질로 보이는 밀도 높은 구형구조 및 수많은 막성소포, 그리고 형태가 일정하지 않은 다포체(multivesicular body)등이 미래의 세포막 사이에 산재함을 볼 수 있었다. 이 둘이 서로 근접한 곳에서는 막성구조가 융합하는 것과 같은 구조들이 관찰되었다. 이와 같은 구조들은 식물극 세포질에서도 볼 수 있었다(Fig. 26). 제1차 난할에서 수축환(contractile ring)이 형성된다면 이와 같은 막성 성분이 세포질로 침투하거나 혹은 세포질에 이미 존재 하였던 액포 등 막성 구조들이 융합되므로서, 침투하는 것과 같이 보이는 구조를 볼 수는 없을 것으로 볼 수 있었다.

고 찰

*Urechis uncinatus*의 동황란을 인공수정 시킨 결과 4세포기, 특히 8세포기에서 동, 식물극 할구의 사선배열이 관찰되었으므로 난할형식(cleavage pattern)은 나선형 난할(spiral cleavage)이었고, 초기 3단계의 난할이

경할(經割)→경할(經割)→수평할(水平割)이었으며, 이후 경할-수평할이 반복되는 것으로 볼 수 있었다. 할구의 사선배열은 유사분열 기구의 선회성에 의존하는 것으로 볼 수 있었으며 나선형 난할임에도 난할 초기부터 유생기(trochophore larvae)까지 전할(holoblastic cleavage)이고 등할(equal cleavage)인 것이 특징이라고 할 수 있었다.

*U. uncinatus*의 난자는 동황란이므로 동물극, 식물극을 구별하는 것이 어려울 수도 있으나 약하지만 핵의 편재성이 있고 심장형 수정란(heart-shaped egg)의 난할구(cleavage furrow)는 동물극에 생성된다는 것과, 제 1차 난할의 경우 유사분열 기구는 동물극-식물극면에 직각으로 발생한다는 것이 일반적인 경우이며(Okazaki, 1975; Von Ledebut-Viliger, 1975), 극체가 돌출하는 반구가 난할구 생성 반구에 대응하는 극이었다는 사실 등으로 동물극, 식물극을 구별하는 것이 가능하였다. *U. uncinatus*의 제1차 난할과정에서 극피 동물에서 보고된 수축환(contractile ring; Asnes, 1979; Schroeder, 1987)과 유사한 구조가 관찰되었으나, 본 연구에서는 이를 확인하는 것이 가능하지 않았다. 전자현미경으로 관찰한 *U. uncinatus* 초기 수정란의 난할구는 세포질 속으로 침투해 있었으며 미세 막성구조들의 연속 융합으로 할구 사이를 경계짓는 것으로 관찰되었다.

*Urechis*의 난할이 나선형 난할(spiral cleavage)이라는 것은 *U. caupo*의 4세포기의 할구 배열에 근거하여 보고된 바 있다(Newby, 1986; Gould-Somero, 1995). *U. uncinatus*에서도 4세포기의 할구들이 평면에 배열하지 않고 *U. caupo*와 같이 일부 할구들이 다른 할구에 비교하여 융기한 것으로 관찰된 바 있었으며, 또한 할구의 좌선성 혹은 우선성 사선 배열이 2세포기에도 있는 것으로 관찰되었다. *U. uncinatus*의 난할기 할구 배열에 좌, 우선성 사선배열한다는 것은 특히 8세포기 할구 배열에서 볼 수 있었으며, 이로서 난할 형식이 나선형이라는 것을 알 수 있었다. 따라서, *Urechis*의 종에 따른 난할형식에는 차이가 없는 것으로 추측되었다.

나선형 난할을 수행하는 일련의 동물들, 즉 *Spiralian*으로 알려진 환형동물(Reverberi, 1971), 일부 연체동물(Freeman & Lundelius, 1982; Verdonk & Biggerlaar,

1983), 편형동물 중에서 최초 3회의 난할이 경할→경할→수평할이고, 최초 2회의 난할이 *U. uncinatus*와 같이 등할인 동시에 전할인 경우는 연체동물에서 볼 수 있으나, 제3차 난할은 연체동물의 예에서 보면 부등할로 알려져 있다 (Reverberi, 1971; Verdonk & Biggelaar, 1983). *U. uncinatus*의 경우는 제3차 난할이 등할이므로 연체동물의 난할형식과는 차이가 있는 것으로 볼 수 있었다. 제3차 난할이 부등할인 것은 식물극 반구와 동물극 반구에 포함된 난황물질의 축적 정도와 이로 인한 유사분열 기구의 생성 장소 및 행위에 의해 결정되며, 등황란, 단황란 등 난자의 종류에 따라 상이하나 부등할이 지속되면 결과에서 대할구, 중할구, 소할구 등이 생산될 수 있다 (Schroeder, 1973; Del-Pino, 1989). *U. uncinatus*와 같이 제 3차 난할이 수평할이며 동시에 등할, 전할인 예는 지금까지 알려진 *Spiralian*에서는 찾기 어려웠고, 방사대칭 난할과 좌우대칭 난할인 극피동물과 강장동물에서 볼 수 있는 특징으로 알려져 있다. 16세포기 이후의 난할 단계에서 할구 크기에 다소의 차이를 볼 수 있는 경우는 있었으나, 이는 각 할구의 난할 시점의 차이인 것으로 볼 수 있었다. 이와 같이 *U. uncinatus*의 난할에서 특이한 사실은 등할, 전할이라는 점에서는 극피동물이나 강장동물과 유사하였고, 나선형 난할이라는 점에서는 환형동물 및 일부 연체동물 등 *Spiralian*과 유사하다는 것이었으며, 일종의 변형된 나선형 난할형식을 갖고 있는 것으로 생각되었다. 한편, 이는 이 동물의 체계적 특성과 연계될 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구의 *U. uncinatus* 수정란에서 나선형 난할의 증거는 4→8세포기 할구의 사선배열에 근거하는 것이었으나, 할구의 배열은 유사분열 장치의 선회성에 원인이 있는 것으로 볼 수 있다. 항- α -, $-\beta$ -튜블린 반응 및 편역형광현미경 관찰에서 보면 각 난할 단계의 유사분열 기구는 특히 4세포기의 유사분열 기구는 동물극-식물극에 수직으로 발생하나 난할 단계에서는 좌선성, 즉 좌측 기울림이 있는 것으로 관찰되었다. 이 좌선성은 8세포기의 배 (embryo)를 동물극에서 관찰했을 때 유사분열 장치의 한쪽 극 (pole)이 식물극을 향하여 기울는 것을 의미하며, 선회각이 최초 유사분열 장치와 사선방향으로 약 45°를 이룰 때 종료되는 것으로 보였다. 제3차 난할은 따라서 유사분열 장치의

축에 대하여 수직인 수평할이었으나, 선회각은 45°이므로 난할 결과 할구의 배열이 식물극과 동물극 사이에 45° 차이의 사선 배열이 가능한 것으로 생각되었다. 이와 같이 유사분열 기구의 기울림 또는 사선배열에 의한 할구의 사선배열 혹은 즉 나선형 배열 (Harris et al., 1980; Sluder et al., 1989; Hamagauich, 2001; Uetake et al., 2002)은 위에서와 같이 일부 연체동물, 환형동물, 편형동물 등에서 볼 수 있다 (Verdonk & Biggelaar, 1983). 나선형 난할에서 할구의 우선성 또는 좌선성은 할구 배열의 대칭을 유지할 수 있도록 교대로 진행된다는 사실에서 볼 때, *U. uncinatus*에서 제3차 난할(4세포→8세포)이 좌선성 (sinistral)이라는 것으로, 2차난할(2→4세포)와 4차 난할(8세포→16)이 우선성이라는 것을 추측할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Asnes CF, Schroeder TE: Cell cleavage: Ultrastructural evidence against equatorial stimulation by aster microtubules. *Exp Cell Res* 122 : 327-338, 1979.
- Alexander NJ: The fertilization of human oocytes at different stages of meiotic maturation. In "In vitro Fertilization" Howard W, Jones Jr. ed. *Annals of the New York Academy of Science* Vol 541, p. 324, 1988.
- 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.
- Choe RS, Shin KS, Ju CN, Hwang, DY: The Differentiation of the female gonial cell in Echiuroid (*Urechis uncinatus*): A fine structural study. *Korean Soc EM* 18 : 77-91, 1988.
- Del Pino M: Modifications of oogenesis and development in marsupial frog. *Development* 107 : 169-187, 1989.
- 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 calm oocytes. *Gamete Res* 3 : 299-304, 1981.
- Freeman G, Lundelius JW: The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Lymnaea peregra*. *Wilhelm Roux's Archives Dev Biol* 191 : 69-83, 1982.

- Gould Somero M, Holland L: Oocyte differentiation in *Urechis caupo* (Echiura): A fine structural study. *J Morphol* 147 : 475 505, 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.
- Harris P, Osborn M, Weber K: Distribution of tubulin containing structures in the egg of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Cell Biol* 84 : 668 179, 1980.
- Kwon HJ, Jeong JW, Kim WJ, Shin, KS: Immunofluorescence and electron microscopic study on the artificial insemination and rotation and shift behaviors of the bipolar spindle fibers in *U. unicinctus*. *Korean J EM* 33 : 105 116, 2003. (Korean)
- 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.
- Masui Y, Markert CL: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 19 : 129 146, 1971.
- Newby WW: The embryology of the Echiuroid worm *Urechis caupo*. *Mem. Amer. Phil. soc.* 16, 1 219, In "Reproduction of marine invertebrates", Vol., III 118 : 148 154, 1986.
- Okazaki K: Normal development to Metamorphosis. In "The sea urchin embryo: biochemistry and morphogenesis." G. Czihiak ed. Springer Verl. pp. 177 232, 1975.
- Reverberi G: Annelids. In *Experimental embryology of marine and freshwater invertebrates*. Reverberi, G ed., Elsevier. North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, pp. 126 163, 1971.
- Schroeder TE: Cell constriction: Contractile role of microfilaments in division and development. *Am Zool* 13 : 949 960, 1973.
- Schroeder TE: Fourth cleavage of sea urchin blastomeres : microtubules patterns and myosin localization in equal and unequal cell division. *Dev Biol* 124 : 9 22, 1987.
- Shin KS: Contribution of body fluid to egg envelope formation in *Echinorhynchus truttae* (Acanthocephala). *J Electron Microscope* 35 : 227 236, 1986.
- 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.
- Stephano JS, Gould, MC: Parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura). I. Persistence of functional maternal asters following activation without meiosis. *Dev Biol* 167 : 104 117, 1995.
- Schultz AW: Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J Exp Zool* 166 : 347 354, 1967.
- 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.
- Verdonk NH, Van den Biggelaar JAM: Early development and the formation of germ layers. In "The mollusca", vol. 3. Development., K. Wilbur ed., Academic Press, New York, pp. 91 122, 1983.

< 국문초록 >

본 연구에서는 동형란인 *U. unicinctus* 수정란의 난할과정과 형식에 대하여 관찰된 바를 보고하였다. *U. unicinctus* 성숙란을 인공수정했을 때 난할은 핵 개방(germinal vesicle breakdown)과 제1, 2감수분열 후에 수행되었으며, 유생기 까지 난할은 등할(equal cleavage), 전할(holoblastic cleavage)이었고 난할형식은 나선형 난할(spiral cleavage)인 것으로 관찰되었다. 최초 3회의 난할이 경할→경할→수평할이었고, 이후 경할 수평할이 반복되는 것으로 보였다. 4세포기에 할구의 배열에서 일부 할구들이 동물극으로 용기한 것과 8세포기에서 식물극 할구 배열이 동물극 할구 배열에 대하여 사선 배열한 것 등은 나선형 난할에서만 볼 수 있는 특징이었으나 제 3차 난할인 수평할에서 등할, 전할인 것이 관찰되므로 나선형 난할을 수행하는 *Spiralian*의 전형에 속하지는 않는 것으로 보였다. 4세포기 이후의 할구 배열이 사선배열, 즉 나선형인 근거를 항 α , β 튜블린 처리에 의해 관찰된 유사분열 기구의 행위로서 볼 수 있었다. 4→8세포기의 유사분열 기구는 동물극 식물극 축에 수직으로 발생하고 사선방향으로 선회한 후 난할하므로서 결과에서 수평할 및 할구의 사선배열이 가능한 것을 볼 수 있었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** The eggs prepared from ovary showed often cytoplasmic indentation and nuclear invagination which recovered round-shapes either by fertilization or resuspension in seawater. $\times 400$. **I: Cytoplasmic indentation.**
- Fig. 2.** Fertilization recovered the round shape of the egg from the indentation and invagination. **GV: Germinal vesicle.**
- Fig. 3.** After fertilization, germinal vesicle breakdown (GVBD) occurred and vitelline layer was elevated to its full thickness (14–16 μm).
- Figs. 4, 5.** The 1st and 2nd polar body appeared at vegetal pole after 40 min. and 90 min of the artificial insemination respectively. **FM: Fertilization envelope, P2: The second polar body.**
- Figs. 6, 7:** The 1st meridional cleavage was equal and holoblastic, began at animal pole forming the intermediated heart-shape of egg from one to two cell stages. **P: Polar body.**
- Figs. 8, 9:** It was suggested contractile ring could be seen at this stage, but electron microscopy revealed the cytoplasmic furrow and its membranous structures extended to vegetal pole.
- Figs. 10–12:** The 2nd meridional cleavage was also equal and holoblastic. Taking a view from animal pole the four blastomeres were not aligned evenly, but one blastomere positioned dextrally above the other cell, implicated a feature of spiral cleavage.
- Fig. 13.** The 3rd cleavage of *U. uncinatus* was equatorial, the blastomeres of vegetal hemisphere displaced obliquely from each blastomere of the animal hemisphere.
- Fig. 14.** The 4th cleavage was suggested to be meridional producing 16 blastomeres.
- Figs. 15, 16:** Blastula were ciliated, moved freely in the medium.
- Figs. 17, 18:** The hatching occurred at termination of gastrular stage and the embryo reached trocophore larvae. **C: Cilia.**
- Fig. 19.** After fertilization, It looks like the germinal vesicle associated with anti- α -, γ -tubulin active microtubules appeared in the cytoplasm. $\times 400$.
- Fig. 20.** The first cleavage was meridional, and its mitotic spindle was aligned perpendicularly to the animal-vegetal axis. $\times 400$.
- Figs. 21, 22.** The second cleavage was also meridional. After alignments of the mitotic spindle parallel with each other, clockwise rotation occurred which induce oblique dextrality of the blastomeres at the next stage. $\times 400$.
- Figs. 23, 24.** Taking view from animal pole, the mitotic spindles of opposite blastomeres were aligned parallel with each other, might meridional cleavage. However, as seen in Fig. 24, the mitotic spindles of each blastomere rotated counter clockwise and induced equatorial cleavage. $\times 400$.
- Figs. 25, 26.** Fig. 25: A mosaic picture of electron micrographs on the first cleavage furrow showed the cleavage furrow extended from animal pole to vegetal pole, but interrupted many times by membranous dense microbodies and vesicles. The aspects of the extensions and interruptions of the cleavage furrow have been drawn and illustrated on Fig. 26. **Arrows: Membranous vesicle, Arrow head: Dense body.**





