

한국 서해산 암컷 덕대 *Pampus echinogaster* (Basilewsky)의 난형성과정 중 난모세포 발달과 난모세포 내에서의 난황형성과정에 관한 미세구조적 연구

김 성 한[†]
(군산대학교)

Ultrastructural Studies on Oocyte Development and Vitellogenesis in Oocytes During Oogenesis in Female *Pampus echinogaster* in western Korea

Sung-Han KIM[†]
(Kunsan National University)

Abstract

The ultrastructural study on oocyte development and the process of vitellogenesis in the oocytes during oogenesis in female *Pampus echinogaster* were investigated by electron microscope observations. In the previtellogenic phase, in particular, several intermitochondrial cements appear in the cytoplasm of the chromatin nucleolus oocyte and perinuclear oocyte. The number of intermitochondrial cements are associated with the multiplication of the number of mitochondria in the early developmental stage. In the early vitellogenic phase, the Golgi complex in the cytoplasm of the yolk vesicle oocyte is involved in the formation of yolk vesicles containing carbohydrate yolks. At this time, many pinocytotic vesicles containing yolk precursors (exogenous substances) by pinocytosis are observed in the cytoplasm near the region of initial formation of the zona pellucida. In the late vitellogenic phase, two morphological different bodies, which formed by the modified mitochondria, appeared remarkably in the yolked oocytes. The one is the multivesicular bodies and another is yolk precursors. The multivesicular bodies were transformed into the primary yolk globules, while yolk precursors were connected with exogenous pinocytotic vesicles near the zona pellucida. After the pinocytotic vesicles were taken into yolk precursors, the yolk precursors were transformed into the primary yolk globules. Thereafter, primary yolk globules mixed with each other, eventually, they developed into secondary and tertiary yolk globules. In this study, vitellogenesis of this species occurred by way of endogenous autosynthesis and exogenous heterogenesis. Vitellogenesis occurred through the processes of endogenous autosynthesis, involving the combined activity of the Golgi complex, mitochondria and multivesicular bodies formed by modified mitochondria. However, the process of heterosynthesis involved pinocytotic incorporation of extraovarian precursors (such as vitellogenin in the liver) into the zona pellucida (by way of granulosa cells and thecal cells) of vitellogenic oocytes.

Key words : *Pampus echinogaster*, Oocyte development, Vitellogenesis

[†] Corresponding author : 010-8907-3093, w0827@kunsan.ac.kr

* 이 논문은 2009-2010년도 탄해수산자원연구소 연구비와 군산대학교의 지원에 의해 수행되었음.

I. 서 론

덕대, *Pampus echinogaster* (Bailewsky)는 농어목(Perciformes), 병어과(Strommateidae)에 속하는 난해성, 외양성 어종으로서 우리나라 남서해, 일본 남부, 동인도제도 등에 분포하고 있다(Kim et al., 2005; Chung et al., 2008). 현재 우리나라에서는 병어과에 병어(*Pampus argenteus*)와 덕대(*P. echinogaster*)가 보고되어 있으나 이들 2종의 외부형태가 유사하여 덕대는 병어로도 취급되어 왔다. 덕대는 횡감으로 미식가들에게 인기가 있어 최근 소비가 점차 증가되어 수요를 충족시키기 위해 무분별한 남획이 성행되어 덕대의 자원량이 날로 고갈되어 가고 있다. 이로 인해 본 종의 자원증대를 위해 자원증식이 필요한 양식 대상종으로 주목을 받게 되었으며, 현재 증양식 사업이 활발하게 진행되고 있다.

지금까지 병어과(Strommateidae) 어류에 관해 연구 보고된 것으로는 우선 병어(*P. argenteus*)에 관해서는 분류(Headrich, 1967), 생태학적 분류(Hayashi, 1972; Higashikawa & Masumitsu, 1974; Higashikawa & Masumitsu, 1976; Higashikawa et al., 1981), 그리고 형태학적 연구(Dwivedi et al., 1976)가 보고되어 있고, 또한 최근에 보고된 번식생태(Chung et al., 2008)와 생식세포 발달의 미세구조와 정자형성과정(Chung et al., 2010) 등이 비교적 상세히 보고되어 있다.

덕대(*P. echinogaster*)에 관하여 연구 보고된 것은 생식에 관하여 생식소 성숙(Jin, 1990)과 성장과 생식(Lee, 1989) 그리고 초기 유생의 형태발달(Yamata, 1976; Yoo et al., 1985)이 보고되어 있다. 또한 자원학적 연구(Basilewsky, 1952; Headrich, 1967; Higashigawa et al., 1984; Lee, 1989)가 비교적 상세히 보고되어 있다. 그밖에 덕대의 경제적 중요성(Abe & Kosaki, 1964)이 단편적으로 연구 보고되어 있다. 이와 같이, 병어과 어류는 자원학적으로 매우 중요한 어종이나 증양

식 기술개발을 위한 번식생태 연구는 우리나라와 일본, 중국 등 모두 제대로 연구되어있지 못한 실정이고 단지 병어와 덕대의 번식생태에 관한 기초자료가 단편적으로 보고되어있을 뿐이다. 이와 같이 일부 연구자들에 의해 단편적으로 연구 보고되어 있을 지라도 앞으로 덕대의 양식기술개발에 이용할 수 있는 기초자료를 축적할 필요가 있다. 따라서 이를 위해 생식 mechanism과 관련된 난모세포의 발달단계별 난황형성 mechanism을 우선적으로 연구하여 이를 밝힐 필요가 있다. 그러나 현재까지 어류의 생식기구와 관련된 이들 난황형성 mechanism을 밝힌 연구결과는 극소수에 지나지 않아 매우 미흡한 실정이므로, 이번에 덕대를 대상으로 양식기술개발을 위한 생식기구의 연구는 양식산업 기술개발에 매우 중요한 기초연구로써 매우 가치있는 연구라고 생각된다.

난황형성과정에서 초기난황형성단계에는 난황포기난모세포의 세포질에서 난황포 내에 미세한 다당류 물질들(글리코겐입자들)이 가득 채워지고 있는데 이것은 난황형성의 내인성 자율합성(endogeneous autosynthetic vitellogenesis)을 거쳐 생성된것이다. 난황포를 형성하는데 관여하는 세포소기관자가 무엇인지 밝히는 것이 중요하다. 같은 단계의 난황포난모세포 내에서 투명대에는 미소공(micropore)이 뚫려 있어, 음세포작용(pinocytosis)에 의해 외인성 단백질성물질(난황전구체)들이 난세포질 내로 들어오게 되는데, 이것은 난황형성의 외인성 타가합성(exogeneous heterosynthetic vitellogenesis)에 의해 일어난 것이다. 이러한 난황형성의 타가합성이 초기난황형성 단계에 출현하는 특징은 쉽게 관찰할 수 있는지? 확인할 필요가 있다.

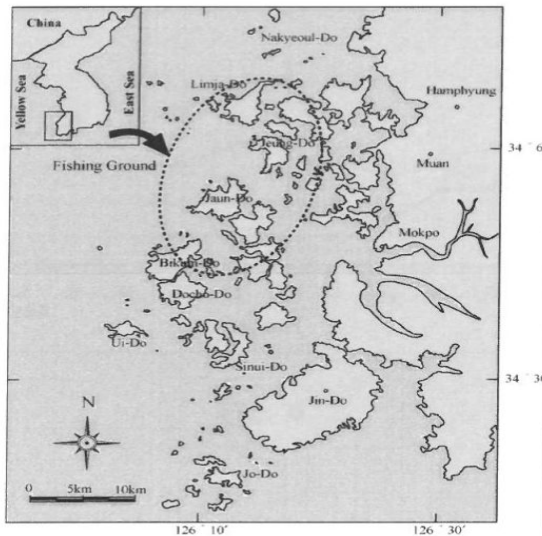
후기난황형성단계에 출현하는 난황구기난모세포에서는 세포질 내에 변형된 미토콘드리아들이 다소포체(multivesicular body)를 내인성 자율합성에 의해 생성된 것이다. 이들 다소포체 물질들은 차후, 초기난황형성단계에 내협막세포층과 외협막세포층 세포들을 경유하여 투명대 내로 들어오

는 간(liver) 내에서 생성된 vitellogenin과 같은 난황전구물질들과 결합하여 결국, 제1차 난황구를 형성하게 된다. 지금까지 연구된 다른 몇 종의 어류들에서 밝혀진 난황형성과정의 결과들이 덕대에서도 동일한 과정을 밟고 있는지 이를 비교할 필요가 있다. 본 연구의 목적은 덕대의 난황형성 mechanism을 난모세포 발달단계 별로 그 특징을 밝혀, 양식기술개발에 활용하고자 조사하였다. 전자현미경을 이용하여 미세구조적으로 조사하였던바 몇 가지 중요한 생식 mechanism과 관련된 결과들을 발견하여 이를 양식기술개발 기초자료로 사용하고자 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 채집방법 및 미세구조적 조사

덕대(*Pampus echinogaster*)는 2009년 1월부터 12월까지 1년간에 걸쳐 우리나라 서해안의 전라남도 무안군 자운도 주변해역[Fig. 1]에서 안강망으로 월 30개체씩 시료를 채집하여 투과전자현미경 관찰용 초박절편을 제작하여 미세구조적 관찰을 하기 위해 사용하였다.



[Fig. 1] Map showing the sampling area

무작위로 20-30개체의 난소를 적출하여 난소 내의 단계별 분화과정과 출현하는 난모세포들의 난황형성과정 중 출현하는 미세구조들의 특징을 상세히 조사하였다.

2. 생식세포 분화 및 난황형성과정의 미세구조적 관찰

덕대의 난소 내 생식세포 분화과정을 조사하기 위해, 투과전자현미경(TEM)을 사용하여 미세구조를 관찰하였다. 현미경 관찰을 위한 조직표본은 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde (0.1M cacodyllate buffer, pH 7.5)에 2시간 정도 전고정한 후 10% sucrose (0.1M cacodyllate buffer, pH 7.5)로 약 10분간 충분히 세척하고 2% osmium tetroxide와 0.2M cacodyllate 1:1용액에서 90분간 후 고정시켰다. 고정이 끝난 조직소편을 ethanol에 의해 탈수시킨 뒤 propylene oxide로 치환하였고 Epon-812 혼합액에 포매하여 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색하여 생식세포 분화 및 난황형성과정의 미세구조적 특징을 전자현미경(TEM 100 CX-II 100KV, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난형성과정(oogenesis)

덕대(*P. echinogaster*)의 난소를 보면, 외형은 좌, 우 2개의 난소로 구분되어있는 좌우비상칭으로 이루어져 있다(Chung, 1985; Chung et al., 2009). 난소의 내부구조는 수많은 다른 어종들과 같이, 덕대의 난소는 다수의 난소소엽들로 구성되어 있다. 난소 내에서의 난형성과정은 난소소엽 내에서 일어난다. 전자현미경 관찰에 의한 난모세포의 형태와 미세구조적 특징에 따라, 난모세포의 발달단계는 편의상 연속적인 4단계 즉, 1) 난원세포단계 2) 전난황형성단계, 3) 난황형성단계, 그리고 4) 성숙단계로 구분된다. 본 조사에서

는 난황형성과 관련된 난모세포와 부착된 과립막 세포(*granulosa cell*)들과 협막세포층(외인성물질의 공급과 관련되고 있음) 세포들의 기능을 조사하였다. 난형성과정(*oogenesis*) 중 각 단계별 난모세포들의 발달과 과립막세포들과, 협막세포층 세포들의 미세구조적 변화 특징들은 다음과 같다.

(1) 난원세포단계(*oogonial phase*)

이 단계에서는, 난소소엽의 생식상과 상에서 난원세포들(약 10-11 μm)이 출현하였다. 난원세포의 형태적 특징은 큰 핵 내에 한 개의 뚜렷한 인이 출현하였고, 세포질 내에서는 소수의 미토콘드리아들과 공포들이 세포질 내에서 출현하였다. 특히, 이 단계에는 소수의 미토콘드리아들이 출현하였을뿐 세포소기관자들의 출현이 수적으로 적어 난원세포단계는 그 발달이 아주 미약하게 나타났다([Fig. 2A]).

(2) 전난황형성단계(*previtellogenic phase*)

난원세포단계의 난원세포들은 제1감수분열 전기에 전난황형성단계(*previtellogenic phase*)로 발달한다. 전난황형성단계는 난황형성이 일어나기 바로 직전의 단계로서, 전난황형성단계는 난모세포의 형태와 구조적 발달단계에 따라 편의상 2종류의 난모세포들 즉, 크로마틴인난모세포(*chromatin nucleolus oocytes*)와 주변인난모세포(*perinucleolar oocyte*)로 구분되어진다. 2가지 난모세포들의 특징은 다음과 같다.

① 크로마틴인난모세포(*chromatin nucleolus oocyte*): 이 세포들의 크기는 난경 12.5-25.0 μm 정도이었고, 모양은 구형이었으며, 난모세포들의 중앙에는 한 개의 큰 핵이 출현하였고, 한 개의 뚜렷한 인이 핵질 내에 출현하였다. 핵 내의 핵질은 중간 정도의 전자밀도를 나타내었다. 한 개의 크로마틴 인(*chromatin nucleolus*)을 전자현미경으로 미세구조를 관찰하여보면, 2가지 성분으로 구성되어 있다. 즉, 느슨하게 치밀한 미세과립성분과 섬유질 성분으로 구성되어 출현하고 있다. Miller (1962, 1966)는 이들 두개의 부분은 RNA와

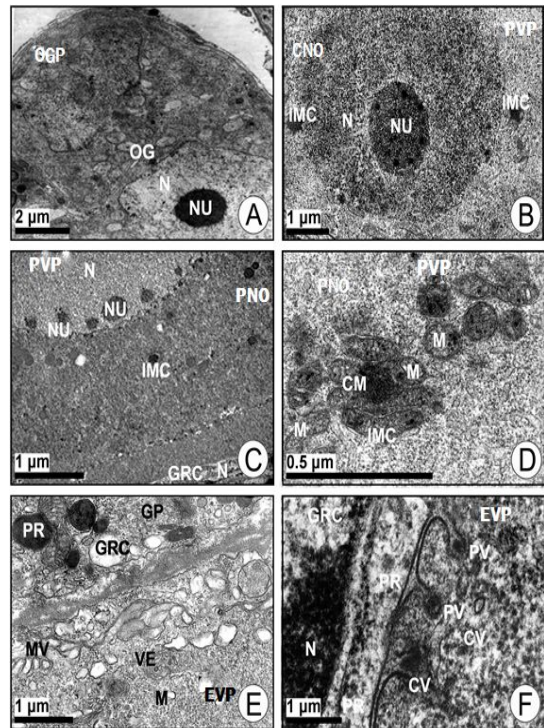
단백질을 함유한다고 보고하였는데, RNA의 합성과 축적이 일어나는 부분은 느슨하게 풀려있는 과립성분의 부분에서 일어나고 있는 것으로 보고되어 있으며, 이 시기에는 대사작용이 매우 활발한 것으로 알려져 있으며 그리고 난모세포의 핵막주변 세포질 내에는 여러 개의 미토콘드리아간 시멘트 (*intermitochondrial cement*)들이 다수의 미토콘드리아들과 함께 출현하였다. 특히, 이 단계에는 미토콘드리아들이 대량증식하기 위해서, 우선 미토콘드리아간시멘트들이 출현하고 이들로부터 미토콘드리아들이 활발하게 증식하는 특징을 관찰할 수 있었다.

일반적으로 어류들의 초기 난소의 발달양상을 보면, 전난황형성단계(*previtellogenic phase*)에는 한 개의 큰 크로마틴인을 가지는 크로마틴인난모세포(*chromatin nucleolus oocyte*)의 세포질 내에서는 미토콘드리아간 시멘트(*intermitochondrial cement*)들이 출현하였다. 이들이 출현하는 것은 난모세포 세포질 내에 미토콘드리아들이 그 수를 증대시키기 위해서, 우선적으로 세포질 내에 미토콘드리아간 시멘트들이 출현하여 그 수적 증대를 시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Toury et. al., 1977; Chung, 1985; Chung et al., 2009). 크로마틴인난모세포의 난황막에는 여포세포들이 출현하는 것을 관찰할 수 없었으며, 난황막에도 미세융모들(*microvilli*)이 아직 발달하지 않았다([Fig. 2B]). 그러나 크로마틴인난모세포들이 30-50 μm 정도로 그 크기가 증가되면 난모세포에 난황막이 발달하기 시작하나 매우 얇게 나타났으며, 이 시기에는 공포들(*vacuoles*)이 출현하였다. 이러한 난모세포들의 특징은 Chung (1985)의 노래미(*H. agrammus*)와 Chung & Chang (1995)의 조피볼락(*S. shlllegeli*)과 Chung et al.(2009)의 쟁뚱어(*B. pectinirostris*)의 크로마틴인난모세포들에서도 유사하게 출현하였다

② 주변인난모세포(*perinuclear oocyte*): 난경이 대략 80-200 μm 로 난모세포가 성장·발달하면, 난황막에는 원형질돌기인 미세융모가 형성되며, 이

때에는 투명대(zona pellucida)의 출현이 처음으로 관찰되기 시작하였다. 투명대를 둘러싸는 과립막 세포들(granulosa cells), 기저막(basement membrane)과 협막세포층(thecal cell layer)들이 출현하였는데, 협막세포층은 다시 외협막세포층(outer thecal cell layer)이 가장 외부에 나타났으며, 내부에는 내협막세포층(inner thecal cells)이 나타났다. 과립막세포들의 모양은 편평형이며, 길게 신장된 타원형의 핵과 세포질 주위에 여러 개의 미토콘드리아와 과립들 및 조면소포체가 나타났다(Chung, 1985; Chung & Chang, 1995). Chung & Chang (1995)은 조피볼락(*S. schlegeli*)의 주변인난모세포에서 핵막 주변에 나타나는 인을 확대하여 관찰하여 보면, 인은 섬유상 성분과 핵산물질의 생성과 관련되어 있는 과립상 성분으로 구분되어 나타났다고 보고하였다. 이때에 세포질 내에는 수많은 미토콘드리아와 조면소포체들이 나타나고 있으며, 주변인난모세포의 핵막주변 세포질 내에서는 여러 개의 미토콘드리아간시멘트(intermitochondrial cement)들이 다수의 미토콘드리아들과 함께 출현하고 있다(Fig. 2C)]. 특히, 이 시기에는 미토콘드리아들이 대량증식하기 위해서, 미토콘드리아간시멘트들이 출현하고, 이들로 부터 미토콘드리아들이 활발하게 증식되고 있는 것이 쉽게 관찰되었다(Fig. 2D)].

일반적으로 어류들의 초기 난소의 발달양상을 보면, 전난황형성단계(previtellogenic phase)에는 처음에 크로마틴인난모세포가 출현하고, 2번째로 핵막 주위에 여러 개의 인을 가지는 주변인난모세포(perinucleolar oocyte)가 출현하고 있다. 2번째 주변인난모세포들의 세포질 내에서도 미토콘드리아간 시멘트(intermitochondrial cement)들이 다수가 나타나고 있다. 미토콘드리아간 시멘트(intermitochondrial cement)들은 주변인난모세포들의 세포질 내에서도 미토콘드리아의 수적 증대로 난모세포 발달을 시키기 위해 우선적으로 출현하고 있음을 알 수 있다(Toury et. al., 1977; Chung et al., 2009).



[Fig. 2] Electron micrographs showing oogenesis in female *Pampus echinogaster* (A~F). A, An oogonium in the oogonial phase; B, A chromatin nucleolus oocyte in the previtellogenic phase; C, A perinucleolar oocyte in the previtellogenic phase; D, Several mitochondria and intermitochondrial cement in the cytoplasm of the perinucleolar oocyte in the previtellogenic phase; E, An early developing yolk vesicle oocyte in the early vitellogenic phase, attaching the granulosa cell; F, Several pinocytotic vesicles and coated vesicles in the cytoplasm of a yolk vesicle oocyte in the early vitellogenic phase, attaching the granulosa cell. Abbreviations: CM, cement; CV, coated vesicle; EVP, early vitellogenic phase; GP, glycogen particle; GRC, granulosa cell; IMC, intermitochondrial cement; M, mitochondrion; MV, microvilli; N, nucleus; NU, nucleolus; OG, oogonium; OGP, oogonial phase; PNO, perinucleolar oocyte; PV, pinocytotic vesicle; PVP, previtellogenic phase; VE, vitelline envelope.

(3) 난황형성단계(vitellogenic phase)

전난황형성단계의 난모세포가 좀 더 발달하면 난황형성단계로 된다. 난황형성단계는 편의상 난황포난모세포들(yolk vesicle oocyte)이 나타나는 초기난황형성단계와 그리고 난황구난모세포(yolked oocyte)들이 출현하는 후기난황형성단계로 구분할 수 있다.

① 초기난황형성단계(early vitellogenic phase): 전난황형성단계의 주변인기난모세포가 좀 더 성장·발달하면 난황포난모세포(yolk vesicle oocyte)가 되는데, 이때의 난경은 약 180-200 μm 정도이었다. 이때 난모세포의 세포질 내에는 미토콘드리아와 공포들만이 출현하였다. 특히, 초기난황형성단계의 난황포난모세포들은 세포질 내에서 특히, 여러 개의 큰 공포들이 골지복합체(Golgi complex) 가까이에서 나타나고 있어 이들은 골지복합체에 의해서 생성되는 것으로 판단되었다.

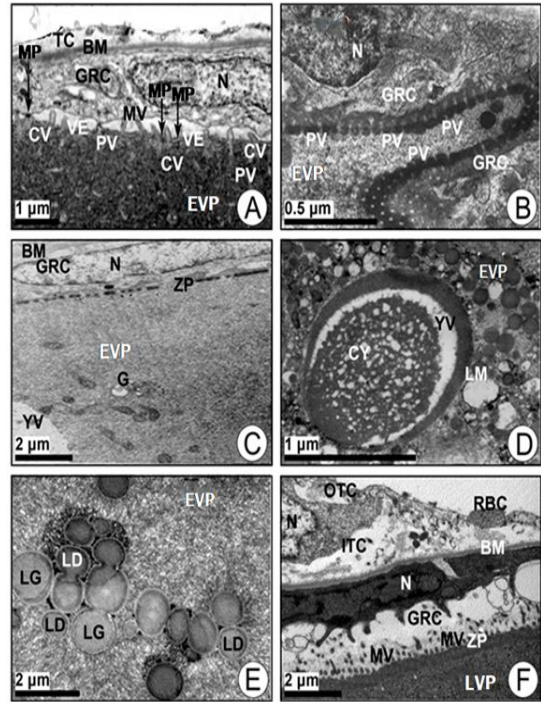
난황포난모세포의 난황막(vitelline envelope)은 아직 미발달한 상태로, 여기에 원형질돌기인 미세융모(microvilli)가 출현하고 있을 뿐이다. 난황막 위에 출현하고 있는 과립막세포(granulosa cell) 세포질 내에서는 단백질성 물질들과 글리코겐 입자들이 소량 축적되고 있는데, 이들 축적된 물질들은 외부로부터 들어온 외인성 물질들로 추정된다. 이때 과립막세포들 위에는 기저막(basement membrane)이 나타나고, 그 위에는 협막세포층들(thecal cell layers)이 출현하나 아직은 그 발달 상태가 아주 미흡하다([Fig. 2E]). 과립막세포들 아래에 위치하고 있는 초기난황형성난모세포의 난황막이 발달하기 시작하면, 과립막세포 아래의 초기난황형성난모세포의 난황막 아래에서 원형질막이 세포질 안쪽으로 함입되어 피복소포들(coated vesicles)을 형성하는데, 피복소포는 세포막으로부터 음세포작용(pinocytosis)이 일어나서 형성된 음소포들(pinocytotic vesicles)이 세포질 내로 들어와 다수의 피복소포들(coated vesicles)이 만들어져 초기난황형성단계의 난황포난모세포들의 난황막 아래 주변부위에는 피복소포들이 출현

하게 된다([Fig. 2F]). 지금까지 알려진 피복소포들의 기능을 보면, 피복소포들은 세포 내에서 물질의 이동뿐만 아니라, 세포 밖에 있는 영양분인 단백질성 물질이나 어떤 특수한 조절단백질(regulatory protein)을 세포 내로 섭취하여 운반하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(Chung et al., 2009). 특히, 난황포기난모세포들이 좀 더 성장·발달하면 난황막이 양적 확장을 위해 구부러진다. 그리고 이때 난황막 아래에는 음세포작용(pinocytosis)에 의해 형성된 음소포들이 세포질 내로 들어와 다수의 피복소포들을 형성하고 있다, 이들 외인성 단백질성 물질들은 난황막의 미세융모에 있는 미소공(micropore)을 통해 세포질 내로 들어와 난황막 아래로 이동하고 있다. 과립막세포들 위에 있는 기저막(basement membrane)은 과립막세포들과 협막세포층들을 구분되게 한다([Figs. 3A, B]).

난모세포의 크기가 좀 더 성장하여 난황포난모세포(난경 200-220 μm 정도)로 되면, 세포질 내에는 지방적들과 미토콘드리아들이 출현하며, 골지체에 의해서 생성된 여러 개의 공포들이 직경 약 4-15 μm 정도인 공포상의 난황포(yolk vesicles)를 형성한다. 난황포들은 각각 한계막(limiting membrane)에 의해 둘러싸여 있는데([Fig. 3C]), 이들의 내부는 미세한 다당류 물질들(carbohydrate yolk)인 글리코겐입자들이 채워져 낮은 전자밀도를 나타내었다([Fig. 3D]). 난황포(yolk vesicle)형성에 관해서는, Chung (1985)이 노래미(*H. agrammus*)의 난황포기난모세포에서 난황포들을 처음으로 미세구조적으로 밝힌 이래, Chung & Chang (1995)이 조피볼락(*S. schlegeli*)의 성장 중인 난황포난모세포에서, 그리고 Chung et al. (1997)에 의해 쥐노래미(*H. otakii*)의 초기난황형성단계의 난황포난모세포에서 난황포에 관해 상세한 보고가 되어 있다. 본 연구에서도 이전에 이미 보고된 상기 연구자들의 결과와 유사한 현상이 나타나고 있음을 관찰할 수 있었는데, 특히, 골지복합체에 의해서 형성된 공포들이 내인성 자

융합성에 의해 난황포를 형성하고 있음을 명확하게 증명할 수 있었다. 그리고 난황포 내에서 자율합성에 의한 다당류 물질의 축적에 관하여는 Chung & Chang (1995)은 조피볼락(*S. shlegeli*)에서 또한 Chung et al. (1997)은 쥐노래미(*H. otaki*)에서, 그리고 Chung et al. (2009)에 의한 쟁뚱어(*B. pectinirostris*)의 초기난황형성단계의 난황포난모세포질 내에서, 골지복합체가 난황포 내에 탄수화물 난황(carbohydrate yolk)을 축적시키는 중요한 역할을 하고 있다고 보고되어 있다. 그리고 난황포들은 한계막에 의해 둘러싸여 있는 것이 전자현미경 관찰에서 재확인되었다. 특히, 초기난황형성단계에 난황막 아래의 피질부에서 음소포(pinocytotic vesicle)들이 출현하였고, 원형질돌기인 미세융모가 형성되어 투명대(zona pellucida)가 형성되었다. 이때 난모세포들이 200-230 μm 로 되면, 난황포(yolk vesicle) 내부에 들어 있던 미세한 다당류 물질들이 글리코젠입자들이 점차 지질물질로 전환된다(Fig. 3E). 난황포난모세포들이 성장해 감에 따라 세포질 내에 난황포들의 수와 크기는 증대되었다.

난모세포 난모세포가 좀 더 성장·발달함에 따라 난모세포의 zona pellucida를 둘러싸고 있는 과립막세포들(granulosa cells), 기저막(basement membrane)과 협막세포층들(thecal cell layer)이 출현하였다. 이때 과립막세포는 기다란 핵을 가지며, 세포질 내에는 다수의 미토콘드리아들이 출현하였다. 협막세포층과 기저막 아래에 위치하는 과립막세포들의 세포질 내에는 높은 전자밀도의 외인성 난황전구물질로 추정되는 단백질성 과립물질들이 출현하였다. 높은 전자밀도를 나타내는 발달 중인 투명대가 과립막세포층에 인접하여 점차 두께를 증대시키고 특히 투명대와 과립막세포들 사이에 여러 크기의 간격(interspace)들이 출현하고 있는데 난모세포의 관상미세돌기인 미세융모가 이 세포공간 속으로 돌출해 들어간다. 미세융모의 모양은 직선 구부러진 것 등 불규칙하였고 투명대(zona pellucida)에 미소공들(micropores)



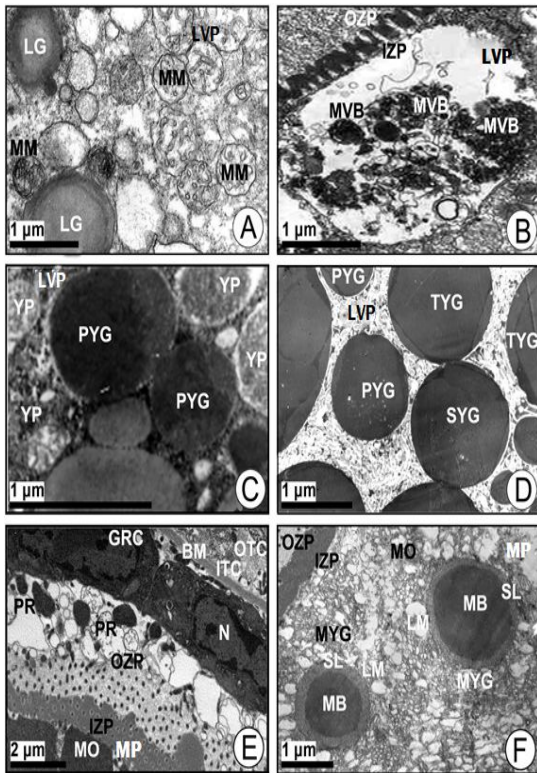
[Fig. 3] Electron micrographs showing vitellogenesis in female *Pampus echinogaster* (A-F). A, B, Formations of several pinocytotic vesicles and coated vesicles in the cytoplasm of a yolk vesicle oocyte in the early vitellogenic phase, attaching the granulosa cell and thecal cell layers. C, D, Yolk vesicles formed by the Golgi complex and carbohydrate yolks in the cytoplasm of yolk vesicle oocytes in the early vitellogenic phase; E, Transformation of carbohydrate yolk substances to lipid droplets and lipid granules in the yolk vesicle oocyte; F, A yolked oocyte in the late vitellogenic phase, attaching to the granulosa cells and the inner thecal cell layer containing the red blood cell. Abbreviations: BM, basement membrane; CV, coated vesicle; CY, carbohydrate yolk; EVP, early vitellogenic phase; GRC, granulosa cell; ITC, inner thecal cell; LD, lipid droplet; LG, lipid granule; MP, micropore; MV, micro villi; N, nucleus; OTC, outer thecal cell; PV, pinocytotic vesicle; PVP, previtellogenic phase; RBC, red blood cell; YV, yolk vesicle; ZP, zona pellucida.

이 출현하였고 음세포작용(pinocytosis)에 의해 외인성 단백질성물질(난황전구체)들이 세포질 내로 들어왔다. 난모세포가 좀 더 발달하면 난황포 속에 들어 있던 글리코겐 입자들이 다수의 작은 지방적(lipid droplet)으로 채워진 후, 좀 더 큰 난황전구물질을 형성하였다. 본 실험 관찰결과에 의하면, 초기난황형성단계의 난모세포 세포질 내에서 관찰되는 잘 발달된 골지복합체들, 조면소포체들 그리고 미토콘드리아들이 세포질 내에서 지방적형성에 관여하고 있는 것으로 추정된다.

② 후기난황형성단계(late vitellogenic phase): 초기난황형성단계의 난황포기난모세포가 좀 더 성장·발달하여 난경이 대략 400-500 μm 정도로 성장하면 후기난황형성단계에 이르며, 그 후 난경이 550-650 μm 정도로 성장 발달하면, 난황구기난모세포들(yolked oocytes)으로써, 난모세포 위에는 과립막세포들과 그리고 기저막 위에는 내협막세포들의 세포층과 외협막세포층이 출현하고 있다. 특히, 내협막세포들의 핵은 길게 신장되어 나타났으며, 세포질 내에는 모세혈관이 연결되어 있고 큰 적혈구세포들(red blood cells)이 출현하고 있어, 이들 세포들은 영양물질의 이동과 운반에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 판단된다([Fig. 3F]). 난황구기난모세포의 난황막은 좀 더 두터운 투명대(zona pellucida)를 가졌다. 두터운 투명대는 외부투명대(the outer zona pellucida)와 내부투명대(the inner zona pellucida)로 편의상 2부분으로 구분되어진다. 후기난황형성단계의 난황구기난모세포에서는 1) 변형된 미토콘드리아(modified mitochondria)와 2) 난황전구체(yolk precursor)에 의해 형성된 형태적으로 서로 다른 2 종류의 소체들이 난황형성과정 중 출현하고 있다. 특히, 이러한 특징은 지금까지 연구된 Chung & Chang (1995)에 의한 조피볼락(*S. shlegeli*)과 Chung et al.(2009)에 의한 쟁뚱어(*B. pectinirostris*)에서도 이미 관찰되어 보고되어 있다. 투명대 주변세포질 내에서 출현하는 미토콘드리아들의 크리스테와 2중막은 불명확하게 변형되어 있었으며, 이들은 그 후 여러 개

의 변형된 미토콘드리아들이 다소포체(multivesicular body)를 형성하였다. 다소포체의 직경은 대략 1.5-2.5 μm 정도이었고, 모양은 원형 또는 타원형으로 한계막(limiting membrane)에 의해 둘러싸여 있다([Figs. 4A, B]). 제1차 난황구형성은 투명대의 미소공(micropore)을 통해 음세포작용(pinocytosis)에 의해 과립막세포의 세포질 내에 축적되었던 단백질성 난황전구물질들이 난모세포질 내로 이동하여 다소포체와 합쳐져 난황전구체(yolk precursor)를 형성하였는데, 이들은 전자밀도가 낮고, 모양은 거의 원형 또는 타원형이며 불연속적인 한계막에 의해 둘러싸여 있다. 난황전구체(yolk precursor)들은 그 후 제1차 난황구(primay yolk globule)로 발달된다([Fig. 4C]). 이들에 제1차난황구들이 합쳐져 제2차 난황구가 되고 이들은 다시 제3차난황구가 된 후, 균질화되었다([Fig. 4D]).

본 연구에서, 상기의 세포소기관자들(cell organelles)이 난황형성의 자율합성과정(autosynthetic vitellogenesis)을 통해 투명대(zona pellucida)에서 출현하고 있다. 이때에 음세포작용(pinocytosis)에 의해 다수의 음세포들이 투명대의 기저부 근처 세포질에서 나타나고 있다. 난황형성의 타가합성과정(heterosynthetic vitellogenesis)을 통해 과립막세포로부터 이동된 난소 밖의 외인성 물질들(extraovarian substances)이 음세포작용에 의해 다수의 음세포들(pinocytotic vesicles)을 세포질 내에 축적하고 있다. Chung & Chang (1995)은 조피볼락에서, 그리고 Chung et al. (2009)은 쟁뚱어의 난황형성과정(vitellogenesis)도 내인성 자율합성과정(endogeneous autosynthesis)과 외인성 타가합성과정(exogenous heterosynthesis)을 통해 일어나고 있다고 보고한바 있다. 일반적인 공통특징은 내인성 자율합성과정은 골지복합체, 미토콘드리아 그리고 변형된 미토콘드리아에 의해 형성된 다소포체들의 결합된 작용에 의해 일어나고 있으나, 난황형성의 타가합성과정은 초기난황형성단계에 내협막세포층과 외협막세포층 세포들을 경유하여



[Fig. 4] Electron micrographs showing vitellogenesis in female *Pampus echinogaster* (A-F). A. Formation of several modified mitochondria by mitochondria in yoked oocyte during the late vitellogenic phase; B. Formation of several multivesicular bodies near the zona pellucida in the yoked oocyte; C. Formations of several yolk precursors and the primary yolk globules in the yoked oocyte; D. Productions of primary yolk globules, secondary and tertiary yolk globules in the yoked oocyte during the late vitellogenic phase; E, A mature oocyte in the maturation phase, attaching to granulosa cells and the inner or outer thecal cell layers; F, A mature oocyte in the maturation phase contains mature yolk globules being composed of three parts: main body, superficial layer and the limiting membrane. Abbreviations: BM, basement membrane; GRC, granulosa cell; ITC, inner thecal cell; IZP, inner zona

pellucida; LG, lipid granule; LVP, late vitellogenic phase; MB, main body; MM, modified mitochondria; MO, mature oocyte; MVB, multivesicular body; MYG, mature yolk globule; OTC, outer thecal cell; OZP, outer zona pellucida; PR, protein substance; PYG, primary yolk globule; SL, superficial layer; SYG, secondary yolk globule; TYG, tertiary yolk globule.

투명대 내로 들어오는 간(liver) 내에서 생성된 vitellogenin과 같은 난황전구물질들이 난소 밖에서 형성되어 음세포작용에 의해 들어와 이들과 결합하는 난황형성의 타가합성과정을 거쳐 난황형성이 일어나고 있다고 보고되어 있는데 (Yamamoto & Oota, 1967; Gupta & Yamamoto, 1971; Chung, 1985; Chung & Chang, 1995; Chung et al., 1997; Chung et al., 2009), 이러한 현상은 본 조사에서도 전자현미경에 의해 미세구조적으로 관찰되고 있다. Chung & Chang (1995)은 조피볼락(*S. shlegeli*)의 난모세포에서, 미토콘드리아는 처음에 다세포체 또는 난황구 난황전구체로 변형되었으며, 이들 2종류의 소체들은 제1차 난황구들(primary yolk globules)로 된 후, 2차, 3차 난황구로 된 후, 최종적으로 성숙난황구를 형성하였다고 보고하였다.

본 연구에서, 덕대(*P. echinogaster*)의 경우는 후기난황형성단계에 난황구난모세포들 내에서 형태적으로 뚜렷하게 다른 2종류의 소체가 변형된 미토콘드리아들에 의해서 형성되는 것이 관찰되었다. 그 중 하나는 다세포체들(multivesicular bodies)로 출현하였고, 또 다른 하나는 난황전구체들(yolk precursors)로 출현하였다. 다세포체들은 제1차 난황구들(primary yolk globules)로 변형되었으나, 난황전구체들은 투명체 근처에 있는 외인성 음세포들(exogenous pinocytotic vesicles)과 관련이 있는 것으로 음세포들이 난황전구체들에 흡수된 후, 난황전구체들은 제1차 난황구들(primary yolk globules)로 변형된 후, 이들 난황구들은 서

로 합쳐져, 2차, 3차 난황구들을 형성한 후, 최종적으로 성숙난황구를 형성하는 것이 전자현미경하에서 관찰되었다.

그러므로 다소포체들과 난황전구체들은 아마도 미토콘드리아(mitochondria)의 공통기원을 가지며, 제1차 난황구들로 변형되는 공통운명을 가지는 것으로 추정된다고 보고되어 있다(Gupta & Yamamoto, 1971; Chung et al., 2009).

(4) 성숙단계(maturation phase) 및 퇴화 · 붕괴

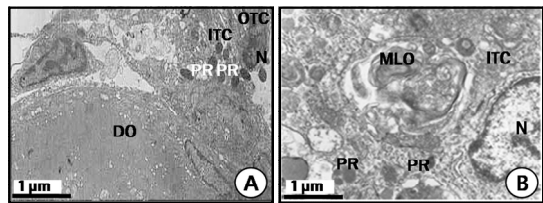
난모세포의 직경이 대략 710-800 μm 로 성장·발달하면 난황물질의 축적이 완료되어 성숙난모세포(mature oocyte)가 된다. 이 시기에는 두터운 투명대에 출현하였던 수많은 미소공(micropore)들이 점차 막혀 흔적만 남는 모습을 관찰할 수 있다[Fig. 4E]. 이 때 세포질 내에는 다수의 성숙난황구가 출현하였는데, 성숙난황구는 3가지의 부분 주소체(main body), 표면층(superficial layer)과 한계막(limiting membrane)으로 구성되어 있는데 특히, 주소체는 전자밀도가 높고 결정구조 형태를 나타내었다([Fig. 4F]).

Raven (1961)에 의하면 난황물질은 화학적 성분에 따라 탄수화물성 난황, 지질성 난황, 그리고 단백질성 난황의 3가지의 주된 성분으로 구분된다고 보고하였다. 일반적으로 단백질성 난황은 탄수화물성 난황과 지질성 난황이 형성된 후 형성된다고 알려져 있다. 단백질성 난황물질의 형성은 후기난황형성단계 중 가장 활발하게 일어난다. 이 결과는 본 연구 결과와 잘 일치하고 있다.

Matsuyama et al. (1988)은 참돔을 대상으로 난황형성과정 중과 난모세포의 성숙기 중에 여포세포들의 미세구조적 변화를 조사하였는데, 난모세포의 여포세포 돌기는 난황형성단계 중에 성장하여 투명대(zona pellucida)에 있는 미세한 난막 공간들을 통해서 서로 접촉하게 되지만, 난모세포가 성숙에 이르면 난막공간의 기능은 사라지게되며, 폐쇄된다고 보고하였다. 본 조사에서 덕대 난모세포의 투명대를 통해 과립막세포로 사출되는

미세용모는 난황형성기간 중에 잘 발달되었으나 완숙난모세포가 되면 투명대는 매우 두터웠을 지라도 미세용모는 사라졌으며, 또한 투명대 내부에는 난막 공간이 존재하나 투명대 최외측의 균일층에서 난막 공간의 입구를 막아 더 이상의 영양물질이 이동될 수 없는 것으로 판단되었다.

성숙난모세포에 부착되었던 과립막세포들과, 내협막 또는 외협막세포층들 사이에 단백질성 물질(가수분해효소 등)이 출현하고 있으며, 여포세포층과 여러 세포들의 세포질 내에서 수초상을 나타내는 구조물들(myelin-like organelle or myelin figure)이 출현하여 세포들이 분리되는 현상을 보였다([Figs. 5A, B]).



[Fig. 5] Electron micrographs showing oocyte degeneration in female *Pampus echinogaster* (A~B). A, A degenerating oocyte attached the inner and outer thecal cells showing degeneration after spawning; B, A degenerating inner thecal cell and degenerating cell organelles (myelin-like organelle or myelin figure) or protein substances occurred by lysosomes. Abbreviations: DO, degenerating oocyte; ITC, inner thecal cell; MLO, myelin-like organelle; N, nucleus; OTC, outer thecal cell; PR, protein substance.

덕대의 경우, 산란기가 지난 후, 미방출 난모세포들 중 호염기성 세포질을 가지는 초기난모세포들은 세포질 붕괴가 일어나지 않았으나, 여포세포층이 형성되고 난황 축적이 시작된 난들의 경우는 모두 세포질 붕괴를 일으켜 퇴화 · 흡수되었다. 추 동계 산란어종인 노래미(*H. agrammus*)의

경우에는 여포세포층과 잔존 퇴화여포에 의해 난모세포가 퇴화·붕괴되는 것이 광학 및 전자현미경에서 관찰되어 보고되어 있다(Chung, 1985).

IV. 결론 및 요약

덕대(*P. echinogaster* (Basilewsky)의 난형성과정 중 전난황형성단계와 난황형성단계에서 일어나는 난황형성의 특징을 미세구조적으로 관찰하여 보면, 다음과 같은 단계별 미세구조적 특징이 작용하여 난황물질이 형성되고 출현하게 되는지 관찰할 수 있었다.

전난황형성단계에서는 크로마틴인 난모세포들(chromatin nucleolus oocytes)과 주변인난모세포들(perinucleolar oocyte)이 출현하였다. 이들 난모세포들의 핵막주변 세포질 내에는 여러 개의 미토콘드리아간시멘트(intermitochondrial cement)들이 그 근처에 다수의 미토콘드리아들과 함께 출현하고 있다. 이 시기에는 미토콘드리아들이 대량증식을 위해 우선 미토콘드리아간시멘트들이 출현하고 이들로부터 미토콘드리아가 활발하게 증식이 일어나는 특징을 보이고 있다.

난황형성단계에서는 초기난황형성단계에는 난황포기난모세포(yolk vesicle oocyte)들이 출현하였고, 후기난황형성단계에는 난황구기난모세포(yolked oocyte)들이 출현하였다.

초기난황형성단계에서는 난황포기난모세포질 내에서 골지복합체에서 생성된 공포들이 난황포를 형성한다. 난황포 내에는 탄수화물 난황물질(글리코젠 입자들)이 축적된 후, 입자들이 다수의 작은 지방적(lipid droplet)으로 채워진다. 그러나 이들 물질은 지질성분으로 전환되어 좀 더 큰 난황전구물질을 형성한다. 이것은 난황형성의 내인성 자율합성에 의해 생성된 것이다. 한편 이 시기부터 투명대를 형성하기 시작하며 이때 난막의 투명대에는 수많은 미소공이 뚫려 있다. 이를 통해 난황전구물질들이 난세포질 내로 들어오게 된

다. 이때 난황막 아래의 피질부에는 음세포작용에 의해 생성된 음세포(pinocytotic vesicle)들이 축적되는 것이 관찰되었다. 이 물질들은 초기난황형성 단계에 난모세포 밖에서 생성된 외인성 단백질성 물질(간에서 생성된 vitellogenin 등과 같은 난황전구체물질들)로 이것은 외인성 타가합성에 의해 생성된 것이다. 초기난황형성단계에서는 난황형성의 내인성 자율합성과정과 외인성 타가합성과정을 통해 난황형성 물질들이 형성되고 있음을 알 수 있다.

후기난황형성단계에서는 난황구난모세포가 출현하는데, 이 시기에는 미토콘드리아가 변형되어 다소포체를 형성한다. 이 현상은 내인성 자율합성과정에서 일어나는 것이다. 한편 이때에 미소공을 통해 세포질로 들어온 외인성 단백질성물질들(난황전구체물질들)이 다소포체들과 결합하여 난황전구체가 된 후, 제1차 난황구가 되는 외인성 물질에 의한 난황형성과정으로 타가합성과정이 이 시기에 활발하게 일어난다. 특히, 이 시기에는 난황막 아래의 피질부에는 음세포작용에 의해 생성된 음세포(pinocytotic vesicle)들이 축적되는 것이 쉽게 관찰되었다. 이 물질은 초기난황형성 단계에 난모세포 밖에서 생성된 외인성 단백질성 물질(간에서 생성된 vitellogenin 등과 같은 난황전구체물질들)이 혈류를 따라 내협막세포층을 통과해 과립막세포를 경유하여 난황구난모세포로 들어와 제1차 난황구를 형성하는 난황형성의 타가합성과정이 일어나고 있다. 그 후 이들은 제2차, 제3차 난황구를 거쳐서 성숙난황구로 발달하여 성숙단계의 성숙난모세포가 된다. 후기난황형성 단계에서도 난황형성은 내인성 자율합성과정과 외인성 타가합성에 의해 난황형성이 일어나고 있음을 관찰할 수 있었다

References

Abe, T. & Kosaki, T.(1964). Notes on an economically

- important but scientifically little know silver pomfret, *Pampus echinogaster* (Pampidae, Teleostei). Jap. J. Ichthyol. 12, 29~31.
- Chung, E. Y.(1985). Studies on the reproductive cycle of greenling, *Agrammus agrammus* (Temminck et Schlegel). Ph. D. Thesis, Pukyong Univ. 76 pp. (in Korea).
- Chung, E. Y. & Chang, Y. J.(1995). Ultrastructural changes of germ cell during the gametogenesis in Korean Rochfish, *Sebastes schlegeli*. J. Kor. Fish. Soc. 28(6), 736~752.
- Chung, E. Y. · Han, H. K. & Kang, H. W.(1997). Reproductive biology of the greenling, *Hexagrammos otakii* in the Yellow sea. I. Ultrastructural study of spermatogenesis. Yellow Sea, 3, 87~94.
- Chung, E. Y. · Bae, J. S. · Kang, H. W. · Lee H. B. & Lee. K. Y.(2008). Reproductive ecology of the silver pomfret *Pampus argenteus* on the westcoast of Korea. Dev. Reprod. 12, 169~181.
- Chung, E. Y. · Choi, K. H. · Jun, J. C. · Choi, M. S. & Lee. K. Y.(2009). Ultrastructural studies on oocyte development and vitellogenesis during oogenesis in female *Boleophthalmus pectinirostris*. Animal Cells and Systems 13, 49~57.
- Chung, E. Y. · Yang, Y. C. · Kang, H. W. · Choi, K. H. · Jun, J. C. & Lee, K. Y.(2010). Ultrastructure of germ cells and functions of Leydig cells and Sertoli cells associated with spermatogenesis in *Pampus argenteus* (Teleostei: Perciformes: Stromateidae). Zoological Stu. 49(1), 39~50.
- Dwivedi, S. N, · Roy, G. N. & Vijayakumuran, K.(1976). Morphological studies on *Pampus argenteus* (Euphrasen). Geobios, Jodhpur, 3, 145~148.
- Gupta, N. N. & Yamamoto. K.(1971). Electron microscope study on the fine structural changes in the oocytes of goldfish, *Carassius auratus* during yolk formation stage. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 22, 187~205.
- Hayashi, I.(1972). On the white pomfret of the East China Sea-II. Relation between the oceanographical condition and distribution of the white pomfret in the south-west region of the East China Sea. Mem. Fac. Fish. Kogoshima Univ. 25, 181~191.
- Headrich, R. L.(1967). The stromateid fishes: Systematics and a classification. Bull. Mus. Comp. Zool. Harv., 135: 31~139.
- Higashikawa, S. & Mashumitsu, S.(1974). On the white pomfret of the East China Sea-I. Relation between the oceanographical condition and distribution of the white pomfret in the south-west region of the Danzyo Islands. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 23, 57~63.
- Higashikawa, S. & Mashumitsu, S.(1976). On the white pomfret of the East China Sea-II. Relation between the oceanographical condition and distribution of the white pomfret in the south-west region of the East China Sea. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 25, 181~191.
- Higashikawa, S. · Nish, T. & Arima, S.(1981). On the White pomfret of the East China Sea-III. Feeding activity. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ., 30: 125~133.
- Higashikawa, S. · Nish, T. · Arima, S. · Masumitsu S. & Utiyama. M.(1984). Deformities found in the pmofret, *Pampus argenteus* (Euphrasen) and *Pampus echinogaster* (Basilewsky) from the East China Sea. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 33, 23~31.
- Jin, J. J.(1990). Gonadal maturation of the pomfrets, *Pampus echinogaster* and *Pampus argenteus* in the Korean Waters. MA. Thesis, Nat'l. Fish. Univ. Busan, 40 pp. (in Korean).
- Kim. I. S. · Choi, Y. · Lee, C. L. · Lee, Y. J. · Kim, B. J. & Kim. J. H.(2005). Illustrated book of Korean fishes. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. 615 pp. (in Korean).
- Lee, D. W.(1989). Growth and reproduction of the Korean pomfret *Pampus echinogaster* from the East China Sea. MA. Thesis, Natl. Fish. Univ., Busan, 51 pp. (in Korean).
- Matsuyama, M. · Adchi, S, · Nagahama, Y, & Matsuura. 1988. Diurnalrhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the red sea bream. *Pagurus major*, during the spawning season. Aquaculture, 73, 357~372.
- Miiller, O. L Jr.(1962). Studies on the ultrastructure and metabolism of nucleoli in amphibian oocytes. In electron microscopy. 2, 8 S.S. Breese Jr. Ed. Academic Press, New York.

한국 서해산 암컷 덕대 *Pampus echinogaster* (Basilewsky)의 난형성과정 중 난모세포 발달과 난모세포 내에서의 난황형성과정에 관한 미세구조적 연구

- Miiller, O. L. Jr.(1966). Structure and composition of peripheral nucleoli of salamander oocytes. Nat. Cancer Inst. Monogr. 23, 53~66.
- Toury, R. • Clerot, J. C. & Andre, J.(1977). Les groupements mitochondiaux des cellules germinales des poissonsTeleosteens Cyprinides. Biol. Cellulaire, 30, 225~232.
- Yamamoto, K. & Oota, I.(1967). An electron microscope study of the formation of the yolk globules in the oocytes of Zebra fish, *Brachydanio rerio*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 17, 165~174.
- Yamata, U.(1976). On young stages of *Pampus echinogaster* from the East China Sea. Uo., 27, 1~26.
- Yoo, J. M.. • Kim, J. M. & Huh, H. T.(1985). A study on the early development of morphology and vertebral column of Korean pomfret, *Pampus echinogaster* (Basilewsky). Ocean Res. Korea, 7, 11~18.
-
- Received : 17 June, 2016
 - Revised : 01 July, 2016
 - Accepted : 12 July, 2016