

아프리카 왕달팽이 (*Achatina fulica*) 난모세포 성숙에 관한 미세구조

장 남 섭* 한 중 민
목원대학교 자연과학대학 생명과학부

Ultrastructural Study on the Maturation of Oocyte in the African Giant Snail, *Achatina fulica*

Nam Sub Chang* and Jong Min Han
Department of Biology, Mokwon University, Taejon 302-729, Korea
(Received October 25, 2000)

ABSTRACT

The observation using an electron microscope shows that the maturation of the oocyte of African giant snail, *Achatina fulica*, proceeds over three stages.

The oocyte of stage 1 is a small elliptic cell ($220 \times 400 \mu\text{m}$) whose light nucleoplasm contains two nucleoli. In its cytoplasm, a number of mitochondria, rough endoplasmic reticula, and ribosomes are found, while yolk granules are not.

The nucleus of the oocyte of stage 2 is relatively large in comparison with the volume of cytoplasm, and contains one nucleolus. In the nuclear envelope comprising inner and outer double membrane, there are found a lot of nuclear pores for materials to pass through. A number of mitochondria, Golgi complex and lipid yolk granules appears in the cytoplasm, and proteinous yolk granules begin to form and mature in the vacuoles of various sizes ($0.8 \sim 3.0 \mu\text{m}$ in diameter).

The oocyte of stage 3 has an enlarged nucleolus. Material transportation through nuclear pore is not found any longer. The cytoplasm in this stage is filled with proteinous and lipid yolk granules. The microvilli are developed around the egg plasma membrane.

Key words : *Achatina fulica*, Maturation, Oocyte, Ultrastructure

서 론

복족강 (Gastropoda) 달팽이류의 난정소 (ovotestis)

는 생식세포인 정자와 난자를 생성 성숙시키는 양성 생식기관으로 알려져 있다. 그러므로 정자의 형성과 변태 과정은 지금까지 많이 연구되어 왔으나 (Gall, 1961; Azevedo & Corral, 1985; Healy & Jamieson, 1989;

* Correspondence should be addressed to Dr. Nam Sub Chang, Department of Biology, Mokwon University, 800 Doan-dong, Seo-Gu, Taejon 302-729, Korea. Ph.: 042-829-7582, FAX: 042-829-7580, E-mail: nschang@mokwon.ac.kr

Griffond et al., 1991; Cuezco, 1994; Chang, 1996, 1998), 왕성한 정자 형성에 비해 상대적으로 그 수가 극히 적은 난자의 생성과 성숙과정에 대해서는 그 연구 실태가 매우 드문 실정이다. 난모세포는 성숙시 난모세포의 핵질에 두 개의 인(amphinucleolus)을 소지하는 경우가 많은데, 그 중 하나는 진정인(eunucleolus)이고 다른 하나는 진정인의 물질대사 활성화로부터 형성된 큰 단백질체(larger protein body)라고 하였다(Bottke, 1973).

이어 Bayne(1968)는 복족강 유폐류 6종(*Agriolimax reticulatus*, *Agriolimax carvanae*, *Arion ater*, *Helix aspera*, *Cepaea nemordis*, *Limnaea stagnalis* 등)의 난세포 표면을 감싸는 막(capsule)의 층을 연구한 결과 그 수와 성분이 종에 따라 각기 다르다는 사실도 확인한 바 있다.

특히 달팽이류 난자형성에 관한 미세구조적 연구는 난자형성(oogenesis) 과정을 제3기로 나눈 Hill & Bowen(1976)과, 제5기로 나눈 Jong-Brink et al.(1976)이 있다.

Jong-Brink et al.(1976)은 제5기 중 제2기에 난모세포의 주위에 여포세포가 밀집되고, 제3, 4기에는 여포세포에 의해 완전히 둘러싸인 후 제5기에서는 여포세포와 난모세포 사이에 여포 틈(follicular gap)이 형성된다고 하였다. 그러나 Hill & Bowen(1976)은 제1기에서부터 영양세포나 종세포와 군집을 형성한 다음, 제2기가 되면 여포세포와 영양세포에 의해 난모세포가 완전히 둘러싸인 바 있다고 하였다.

또한 난모세포의 난황과립 형성에 관해서는 *Biomphalaria glabrata*를 대상으로 한 Jong-Brink et al.(1976)의 연구가 있다. 난황과립 중 단백질성난황과립들은 골지복합체나 과립성소포체에서 분리된 소포로부터 형성되는데 이들은 전난황과립(pro-yolk granule)을 거쳐 미성숙난황과립(immature yolk granule)과 성숙형 난황과립으로 발전한다고 하였다.

그러나 Hill & Bowen(1976), Barre et al.(1991)은 난모세포의 성숙은 세포질내 존재하는 세포소기관들의 출현과 난황과립의 생성 및 숙성과정을 통해 이루어진다고 하였다. 그러나 이러한 현상은 종에 따라 다양하게 나타나고 있는 바, 식용으로 널리 이용하고 있는 아프리카 왕달팽이를 대상으로 한 전자현미경

을 통한 미세구조적으로 상세히 관찰한 논문은 매우 드문 실정이다. 이에 아프리카 왕달팽이를 재료로 난모세포의 성숙과정을 상세히 밝히고자 본 실험을 시도케 되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료

2000년 3월경 경기도 근교의 달팽이 사육농원에서 아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*)를 실험실로 옮겨 사육관찰한 후 실험재료로 사용하였다.

2. 실험방법

아프리카 왕달팽이를 30% ethyl alcohol로 마취시킨 다음 개복한 후 난정소를 적출 하였다. 재료는 실험에 사용할 수 있도록 적당한 크기로 잘라낸 후, 2.5% paraformaldehyde-3% glutaraldehyde로 1시간 30분 전고정하고, 이어서 OsO₄로 2시간 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 0.2 M phosphate buffer (pH 7.3)로 3회 세척하고, ethanol 농도순으로 탈수시킨 다음, 통상법에 의하여 Epon 812로 포매하였으며 60°C 파라핀 오븐에서 40시간 경화시켰다.

Epon블럭은 LKB-V ultramicrotome을 사용하여 1 μm 두께의 박절편을 만들고 이를 methylene blue-basic fuchsin 이중염색 후 광학현미경하에서 정확한 부위를 확인한 다음, 초박절편을 만들었다. 초박절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 한 후, Hitachi H-600 투과전자현미경(80 kV)으로 관찰하였다.

결 과

아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*)는 자·웅 동체로 한 개의 난정소를 소지하고 있다. 난정소는 많은 수의 소엽으로 나누어지고 소엽내에는 대부분 정자의 형성과정에서 볼 수 있는 어린 정원세포와 정모세포 그리고 성숙된 정자들로 가득 차 있는데 비해 난원세포나 난모세포들의 성숙과정을 관찰하기는 비교적 드문 실정이다.

자생생식세포인 어린 난원세포(oogonium)는 직경

이 10 μm 정도 크기의 원형 또는 타원형 세포였다. 이들은 세포질에 비해 크고 전자밀도가 높은 핵을 소지하고 있었으며 이질염색질의 발달이 뚜렷하였다. 이들은 대부분 무리지어 나타나는 경우가 많았으며 제1기 난모세포로 발달하였다 (Fig. 1).

제1기 난모세포(oocyte)는 크기가 $220 \times 400 \mu\text{m}$ 정도인 난원형의 세포로서 핵 또한 난원형이었고 핵질은 비교적 밝게 보였다. 밝은 핵질 속에는 핵에 비해 용적이 큰 직경 6 μm 정도 크기의 인과 2.5 μm 정도인 작은 인등이 관찰되었으며 그 주위로 둥근 형태인 과립상의 이질염색질(크기 0.5~1 μm) 등이 분산되어 있었다. 핵을 둘러싸고 있는 세포질층은 비교적 얇았고 전자밀도는 높게 나타났다. 세포질 내에는 0.2 μm 정도 크기의 다수의 사립체가 과립성소포체, 리보솜 사이에 균일하게 분포되어 있었고 다양한 크기의 공포들도 관찰되었다. 특히 사립체 속에는 수평으로 발달된 사립체능이 뚜렷하였다 (Figs. 2, 3, 4).

제2기 난모세포의 핵(직경 40 μm)은 세포질 대비 매우 큰데 비해, 인은 작았다(직경 1 μm) (Fig. 5). 핵막에는 무수히 많은 핵공이 존재하였으며 이들을 통해 활발한 물질 이동현상이 목격되었다 (Fig. 9). 또한 세포질은 전자밀도가 점차 높아져서 어렵게 관찰되고 다양한 형태와 크기(직경 0.5~2 μm)를 가진 사립체들로 가득 차 있었는데, 이들 사립체들은 전자밀도가 매우 높아 검게 관찰되었다 (Figs. 6, 7). 또한 내막으로부터 형성된 사립체능들은 종축에 평행하거나 불규칙하게 발달해 있었다. 세포질 속에는 크고 작은 공포들(직경 0.8~3 μm)과 과립성소포체 그리고 골지체들이 다수 관찰되었으며 지방성난황과립(직경 1~2 μm)의 축적도 일어나고 있었다.

대소형 공포들 속에는 전자밀도가 높아서 검게 보이는 단백질성난황물질의 축적현상이 다양하게 관찰되었는데 대부분 공포의 중앙부위로부터 축적이 일어나기 시작해서 점차 농축이 확산되어가는 양상을 보였다 (Fig. 8). 난모세포의 표면은 당피막으로 보이는 돌기물과 약간의 짧은 미세융모로 이루어져 있었다 (Fig. 7).

제3기 난모세포의 핵은 제2기 난모세포의 핵에 비해 세포질 대비 작아져 있었으며 핵질에는 한 개의 큰 타원형 인(크기 $1.5 \times 0.26 \mu\text{m}$)을 소지하고 있었다.

타원형 인의 측면에는 인에 비해 전자밀도가 낮은 타원형 큰 단백질체(large protein body)(크기 $0.5 \times 0.7 \mu\text{m}$)가 좁은 간격을 통해 핵과 연결되어 있었고, 이들 인과 단백질 주위로 많은 입자상의 염색질들이 둘러싸고 있었다 (Figs. 10, 11). 핵막은 비교적 불규칙했으며 핵공은 관찰되지 않았다. 핵막 주위에서 수조가 팽창된 과립성소포체와 자유리보솜들이 상당수 관찰되었다 (Fig. 12).

제3기 난모세포의 세포질에는 많은 수의 단백질성난황과립과 지방성난황과립, 소포체(과립성소포체와 무과립성소포체)들 그리고 글리코겐 입자와 구형의 사립체들로 가득 차 있었다.

특히 단백질성난황과립의 경우는 골지체나 과립성소포체로부터 형성된 공포속에서 농축과정을 거쳐 형성되고 있었으며, 농축과정에 따라 3종류의 과립으로 분류되었다. 즉, 직경 2 μm 정도 크기의 전자밀도가 매우 높은 검은 바탕에 흰 반점을 소지한 큰 과립(A형) (Fig. 13)과, 직경 1 μm 정도 크기의 과립으로 중앙에는 전자밀도가 높은 둥근 핵이 있고 그 주위를 가리는 섬유상의 물질로 둘러싸인 과립(B형) (Fig. 14) 그리고 중앙의 전자밀도가 높은 둥근 핵을 굵은 선분과 섬유상물질로 둘러싸인 직경 0.6 μm 정도 크기의 작은 과립(C형) (Fig. 16) 등이다. 이들 과립사이에서 관찰된 구형의 사립체들은 기질 속에 사립체능을 다수 소지한 것 이외의 전자밀도가 매우 높은 많은 반점들을 소지하고 있었다 (Fig. 15). 반점들은 경우에 따라서는 사립체 속을 가득 채우기도 하였다.

또한 제3기 난모세포의 난막에는 제2기 난모세포에서는 볼 수 없었던 다양한 크기(길이 0.25~0.75 μm)와 모양을 가진 미세융모들이 다수 관찰되었는데 특히하게도 이들의 상단에는 당피막으로 구성된 미세융모안테나(antennulae microvillares)가 부착되어 있어 전자밀도가 높은 둥근 공처럼 보였다 (Fig. 17).

고 찰

달팽이류의 난정소는 생식세포인 정자와 난자를 생성하고 성숙시키는 양성생식기관으로 알려져 있다.

Jong-Brink et al. (1976)은 달팽이류 *Biomphalaria glabrata*의 난정소에서 난자생성과정(oogenesis)을 5

단계로 나눈 반면, Hill & Bowen (1976)은 *Agriolimax reticulatus*를 대상으로한 연구에서 3단계로 나눈 바 있다.

즉, 제1기 난모세포는 영양세포나 색소세포들과 함께 기저막에 접촉되어 있고 세포질에는 리보솜과 약간의 소포체, 골지체 그리고 사립체들이 출현하였으며 핵내에는 2개의 인들이 관찰된다고 하였다(Bottke, 1973).

*Achatina fulica*를 재료로 한 본 실험에서도 제1기 난모세포가 선포(acinus)의 기저막에 연결되어 있고 그 주위에서 영양세포가 관찰되었으며, 핵내에는 2개의 인을 그리고 세포질에는 많은 사립체와 리보솜 그리고 약간의 소포체 등이 관찰된 바 있어 Bottke (1973)의 연구 결과와 일치하였다.

Bottke (1973)는 난모세포들이 성숙 제2기가 되면 세포질 속에 지방과 글리코겐 그리고 초기 난황물질들이 나타나기 시작하며, 제3기 난모세포가 되면서부터는 세포질내에 단백질성난황과립과 지방성난황과립들이 많이 쌓이게 되고 이어 세포의 표면에는 원형질막으로부터 형성된 미세융모가 관찰된다고 하였다.

*Achatina fulica*를 대상으로 한 본 연구에서도 Hill & Bowen (1976)처럼 난모세포의 성숙과정을 제3기까지 나눌 수 있었으며 제2기에는 다수의 사립체와 과립성소포체 그리고 단백질성난황과립, 지방성난황과립들이 나타나기 시작하였다. 특히 단백질성난황과립인 경우는 소포체나 골지체로부터 다양한 크기의 공포들이 형성된 후 공포 속에서 과립들의 성숙을 위한 농축 작용이 일어나고 있어 Hill & Bowen (1976)과 Bottke (1973)의 실험 결과와 같았다.

또한 Jong-Brink et al. (1976, 1983)은 *Biomphalaria glabrata*에서 난황과립들을 당단백질성과립과 인지질성과립 등 두 종류로 나눈 바 있으며, 특히 단백질성 과립들은 한계막으로 둘러싸여 있고 골지체나 소포체 주위에서 많이 관찰된 데 비해 지방성과립들은 한계막이 없고 전자밀도가 낮아 밝게 관찰됨으로서 형태적 관찰을 통해서도 종류 구별이 가능하다고 하여 본 연구(*Achatina fulica*)의 결과와도 일치하였다. 그러나 본 연구에서는 단백질성과립들이 3종류(A, B, C형)가 관찰되고 이들의 농축과정도 다양하게 관찰

된 바 있어 약간 달랐는데, 이는 아마도 종의 차이에서 오는 현상일 것으로 사료되었다.

특히 Bottke (1973)는 제2기 난모세포가 제3기 난모세포로 성숙되면 난모세포의 원형질막으로부터 형성된 것으로 보이는 미세융모가 밀생되는 현상을 관찰한 바 있다고 했는데, 본 연구에서도 제2기 난모세포에서 볼 수 없었던 미세융모가 제3기 난모세포로 성숙되면서 난막의 표면에서 발생하였고 그 상단에는 당피막으로 구성된 미세융모안테나도 관찰되어 거의 같은 결과였다.

본 연구에서는 제2기 난모세포의 핵질과 세포질을 나누는 핵막에서 많은 수의 핵공과 이들을 통한 물질 이동 현상이 관찰된 바 있었다. 이러한 현상은 난황과립들의 형성이 완료된 제3기 난모세포에서는 확인되지 않았는데, 이는 난황물질 합성이 가장 활발한 제2기에 핵막을 통한 영양물질의 이동현상과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료되나, 보다 상세한 연구는 이를 뒷받침할 수 있는 생리, 생화학적 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구를 위하여 식용왕달팽이를 지원해 주신 화성농산의 이천형 집사님께 감사사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Azevedo C, Corral L: The fine structure of the spermatozoa of *Siphonaria algeriae* (Gastropoda, Pulmonata). J Morphol 186: 107-117, 1985.
- Barre P, Bride M, Beliard R, Petracca B: Localization of yolk proteins and their possible precursors using polyclonal and monoclonal antibodies, in *Helix aspersa*. Cell Moll Biol 37: 639-650, 1991.
- Bayne CJ: Histochemical studies on the egg capsules of eight gastropod molluscs. Proc Malac Soc Lond 38: 199-212, 1968.
- Bottke W: Lampenb rstenchromsomen und Amphinukleolen in Oocytenkernen der Schnecke *Bithynia tentaculata* L. Chromosoma 42: 175-190, 1973.
- Chang NS: Ultrastructural Study on the spermatogenesis of

- Korean slug *Incilaria fruhstorferi*. Korean J Electron Microscopy 26 : 33-45, 1996. (Korean)
- Chang NS: A ultrastructural study on the axoneme formation in the spermatozoa of the Edible Giant Snail, *Achatina fulica*. Korean J Electron Microscopy 28 : 513-525, 1998. (Korean)
- Cuezzo MG: Ultrastructure of the mature spermatozoa of the land snail *Epiphragmophora tucumanensis* (Doering, 1874) (Gastropoda: Helicoidea). J Moll Stud 61 : 1-7, 1994.
- Gall JB: Centriole replication. A study of spermatogenesis in the snail. *Viviparus*. J biophys biochem Cytol 10 : 163-193, 1961.
- Griffond B, Dadkhah-Teherani Z, Medina A, Bride M, Ultrastructure of *Helix aspersa* spermatogenesis: Scanning and transmission electron microscopical contriution. J Mollusc Stud 57 : 277-287, 1991.
- Healy JM, Jamieson BGM: An ultrastructural study of spermatozoa of *Helix aspersa* and *Helix pomatia* (Gastropoda, Pulmonata). J Mollusc Stud 55 : 389-404, 1989.
- Hill RS, Bowen ID: Studies on the ootesis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). 1. The oocyte. Cell Tissue Res 173 : 465-482, 1976.
- Jong-Brink M de, Wit A de, Kraal G, Boer HH: A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. Cell Tissue Res. 171 : 195-219, 1976.
- Jong-Brink M de, Boer HH, Joesse J: Mollusca. In K.G. Adiyodi and R.G. Adiyodi (eds): Reproductive Biology of Invertebrates, Volume I: Oogenesis, Oviposition, and Oosortion New York: John Wiley & Sons, pp. 297-355, 1983.

< 국문 초록 >

아프리카 왕달팽이(*Achatina fulica*)의 난모세포 성숙 과정을 전자현미경을 통해 관찰한 결과 3단계 과정으로 나눌 수 있었다.

제1기 난모세포는 그 크기가 $220 \times 400 \mu\text{m}$ 정도의 작은 타원형의 세포로서 밝은 핵질속에 2개의 인이 존재하였다. 세포질에는 많은 수의 사립체와 조면소포체 그리고 리보솜이 있었으며 난황과립들은 관찰되지 않았다.

제2기 난모세포의 핵은 세포질의 용적에 비해 비교적 크고 한 개의 인을 소지하고 있었다. 내, 외 이중막으로 구성된 핵막에는 많은 핵공이 관찰되고 이를 통해 물질 이동 현상이 관찰되었다. 세포질에는 많은 수의 사립체, 골지체 그리고 지방성 난황과립들이 출현하였으며, 대, 소형의 공포(직경, $0.8 \sim 3.0 \mu\text{m}$)들 속에는 단백질성난황과립들이 형성, 성숙되고 있었다.

제3기 난모세포는 핵에 비해 핵소체의 크기가 증대되었고 핵공을 통한 물질이동현상은 관찰되지 않았다. 세포질 속에는 성숙된 단백질성난황과립과 지방성난황과립들로 가득 차 있었으며, 난막의 주위에는 미세융모가 발달해 있었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Light micrograph showing oogonium in the ovotestis. arrow, oocyte of stage 1; arrowhead, oogonium. Scale bar = 30 μm .
- Fig. 2.** Electron micrograph showing the oocyte of stage 1. Scale bar = 25 μm .
- Figs. 3, 4.** Magnification of the fig. 2. Electron micrographs of nucleolus and cytoplasm. arrow, rough endoplasmic reticulum; Ch, chromatin; M, mitochondria; Nu1, Nu2, nucleolus; V, vacuole. Scale bars = 3 μm , 1 μm .
- Figs. 5-8.** Electron micrographs showing the oocyte of stage 2. arrow, yolk granule; openarrow, microvilli; ER, rough endoplasmic reticulum; L, lipid granule; M, mitochondria; N, nucleus; Nu, nucleolus; V, vacuole. Scale bars = 10 μm , 4 μm , 4 μm , 2 μm .
- Fig. 9.** Magnification of the fig. 6. Electron micrograph of nuclear envelope. arrow, nuclear pore; ER, rough endoplasmic reticulum; M, mitochondria. Scale bar = 1 μm .
- Fig. 10.** Electron micrograph showing the oocyte of stage 3. Scale bar = 10 μm .
- Figs. 11, 12.** Magnification of the fig. 10. Electron micrographs showing the nucleus. arrow, nuclear envelope; Ch, chromatin; ER, rough endoplasmic reticulum; Nu, nucleolus; P, protein body. Scale bars = 5 μm , 1 μm .
- Figs. 13-16.** Magnification of the fig. 9. Electron micrographs showing the proteinous yolk granules (A, B, C) and lipid yolk granules (L). ER, rough endoplasmic reticulum; M, mitochondria; V, vacuole. Scale bars = 2 μm , 1 μm , 1 μm , 0.5 μm .
- Fig. 17.** Electron micrograph showing the antennulae microvillares (arrow) on the plasma membrane of the oocyte of stage 3. Scale bar = 1 μm .







