

## 항-액틴-금 입자 표지에 의한 개불 (*Urechis unicinctus*) 정자 및 정세포 핵 Actin의 분포

신길상\*, 김호진, 김완중  
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

### Localization of Anti-Actin-Gold Particles (10 nm) Labeled to Nuclear Actin of *Urechis* Sperm and Spermatids

Kil-Sang Shin\*, Ho-Jin Kim and Wan-Jong Kim  
Department of Life science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University,  
Choongnam, Asan 336-745, Korea  
(Received November 8, 2000)

#### ABSTRACT

*Urechis unicinctus* spermatogenic cells, sperm and spermatids, prepared from testis are investigated to identify nuclear actin using amoeba monoclonal anti-actin as the first Ab and gold particles (10 nm) conjugated mouse IgG (immunogold) as the Ab marker. The Ag-Ab reactions analyzed the localization of nuclear actin of the spermatogenic cells and the immunogold particles incorporated mainly with nuclear matrices. A few immunogold particles are merged into the acrosomes and the other architectures of spermatogenic cells, such as mitochondrion and centrioles.

It is often observed and there is a tendency in which the incorporated immunogold particles are increased in number in the nuclear matrices of sperm compared with that of spermatids. The increments and decrements of the incorporated immunogold particles according to developmental stages and the spermatogenic architectures are interpreted and discussed in aspect of acrosomal function and of nuclear condensation of spermatids.

**Key words** : Acrosomal process, Anti-actin, Anti-actin-gold, Nuclear condensation, Spermatids

#### 서론

해변 동물인 개불과 성게는 서식 환경, 난자의 형태, 수정 형식 및 난할 유형의 여러 단계, 특히 2환구기에 심장형 난할구(heart shaped cleavage furrow)를

형성하므로써(Shin, 1992; Kim et al., 1995) 계통 발생학의 관점에서 볼 때 매우 가까운 위치인 것으로 인식되고 있다. 그러나 성게의 정자는 활성화 단계 또는 수정 시 실질 기능이 있는 첨체돌기(acrosomal process)가 발달하지만 개불 정자는 형태적으로 상당한 크기의 첨체가 있음에도 수정 시 첨체돌기가 분명하

\* Correspondence should be addressed to Dr. Kil-Sang Shin, Department of Life science, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Choongnam, Asan 336-745, Korea. Ph.: 041-530-1252, FAX: 041-530-1256, E-mail: shinks@asan.sch.ac.kr  
Copyright © 2000 Korean Society of Electron Microscopy

게 발달하지 않았으며 (Kwon et al., 1994; Kim et al., 1995), 인공수정에서도 성체와 유사한 침체돌기가 형성된다는 구조적 증거를 관찰하기 어려웠고 따라서 수정에 기여하는 실질 기능도 약한 것으로 알려지고 있다 (Shin, 1998; Kwon et al., 2000). 침체돌기의 형성은 많은 예에서 액틴 단량체 (G-actin)의 중합의 한 actomere 형성을 의미하지만 (Inoue, 1982) 정자내의 G-액틴의 위치는 보고된 동물에 따라 서로 달라서 일반성이 없고 종 특이성이 있는 것으로 알려지고 있다 (Fouquet, 1992).

본 연구에서는 이와 같은 개불 정자 침체돌기 형성 및 침체반응을 이해하고자 전자현미경 수준의 항원-항체 반응으로서 개불 정자에 존재하는 액틴의 위치와 분포를 알아보는 한편 미약한 침체반응이 정자에 포함된 액틴의 위상 (phase)과 관련되는가를 관찰하고자 하였다. 본 연구의 결과에서 개불 미수정 및 인공수정 정자 핵질 (nuclear matrices)에 많은 금 입자들이 결합한 것을 관찰할 수 있었던 반면, 침체 및 다른 부분에는 반응하지 않았거나 혹은 소수의 금 입자들이 결합한 것을 볼 수 있었다. 개불 정자 및 정세포는 G-액틴과 결합하는 것으로 알려진 아메바 항-액틴 (Prigent, 1993)으로 처리하고 이 항체 항-생쥐 IgG-금 입자로 표지하였으므로 금 입자들로 표지된 부분에 G-액틴 혹은 G-액틴 oligomer가 존재하는 것으로 볼 수 있었다. 금 입자들로 표지되지 않은 또는 비특이적 결합을 보이는 침체와 정자의 다른 부분에는 상이한 위상의 액틴이 존재하거나 혹은 포함된 G-액틴의 양 (量)과 관련되는 것으로 추측하였다. 한편 정세포에 비교하여 정자 핵질 (nuclear matrices)에 보다 많은 금 입자들이 표지되는 경향은 다른 동물과 같이 정자 발생의 어떤 시기에 액틴 부분 농도의 변화와 섬유성 액틴 (F-actin)의 탈중합 반응으로 액틴이 재배열되므로써 정세포 핵의 형태 변화 및 응축이 유도되는 현상 (Fath & Burgess, 1994)이 개불에도 있을 것으로 사료되었으며 이 내용을 보고하고 고찰하고자 한다.

## 재료 및 방법

실험 재료인 한국산 개불 (*Urechis unicinctus*)은 충

남 서산군 남면 몽산포와 안면도 해변에서 4~5월 干潮時에 채집하였다. 채취한 정자는 수정력과 활성을 고려하여 정소의 상층 내지는 중간층에서 채취한 것을 사용하였다 (Shin, 1992; Kwon et al., 1994). 개불의 침체돌기 및 이를 형성하는 물질을 규명하기 위해서 인공 수정이 필요하였으며 이는 Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과한 해수 (20~25%)에 난자:정자를 1:400으로 혼합하고 3~5분간 방치하므로써 인공 수정하였다.

## 1. 대조군

재료인 정세포 및 정자는 정소로부터 추출하였다. 개불을 채집한 시기의 정소에는 여러 발생 단계의 응성 생식세포들이 포함되어 있으나 정세포 및 정자는 정소의 중간층 이상에서 채취할 수 있었다. 채취한 정소는 PBSB (phosphate buffer, 0.1 M; saline 0.15 M; 1% BSA; pH 7.2)에서 세척하고 대조군과 실험군으로 나눈 후 각각 2가지 방법으로 고정하였다. 대조군은 0.1 M 인산 완충 용액으로 0.1%  $\text{CaCl}_2$ 를 포함하는 0.1 M 인산 완충 용액으로 0.5% 글루타르알데히드 + 4% 파라포름알데히드를 제조하였으며, 이 고정액에 4시간동안 1차 고정하고 0.1%  $\text{CaCl}_2$ 를 포함하는 0.1 M 인산 완충 용액으로 2.5% 글루타르알데히드에 2시간동안 재차 고정하였다. 재료는 인산 완충 용액으로 세척한 후  $\text{OsO}_4$ 에 2시간 최종 고정하였다. 알코올 농도에 따라 탈수하고 araldite에 포매한 후 45°C에서 4일간 중합하였다. 처리의 각 단계에서 재료를 모으기 위한 저속 (300~500 rpm) 원심 분리는 초기에 필요했을 뿐, 그후에는 정자가 응집되었으므로 필요하지 않았다. 침체돌기 유도실험을 위한 재료는 난자의 파편을 포함하는 용액을 슬라이드 유리에 놓고 필요한 양의 정자를 혼합하였다. 인공수정에 사용한 재료는 난자:정자 = 1:400으로 혼합하고 수정 1~10분 사이의 임의의 시간에 고정하였다.

## 2. 실험군 (항-액틴-gold particle 표지)

항-액틴 금 입자 처리는 원칙에서 De May (1983)의 포매 후 처리법 (post embedding methods)을 사용하였으나 약간의 변형된 부분이 있고 이는 다음과 같다.

항-액틴-금 입자 반응군은 0.1% CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 0.1 M 인산 완충 용액으로 0.5% 글루타르알데히드+4% 파라포름알데히드에 고정된 후 탈수하고 araldite에 포매하였다. 블록은 대조군과 같은 방법으로 탈수, 중합되었고 70~80nm로 초박절편 한 후 니켈(nickel) 그리드에 부착하고 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 부각하였다. PBSB로 제조한 젤라틴(pH 7.2)과 글리신 용액으로 그리드를 처리하고 PBSB에 세척한 후 1:100~1:200배 희석한 Amoeba monoclonal anti-actin (mouse-IgG1 iso-type)으로 습기상자(moisture chamber)에서 4시간 처리하였고 여러 번 세척하였다. 금 입자는 PBSB에 1:200으로 희석하여 입자의 농도를  $5.85 \times 10^{10}/\text{ml}$ 로 조절한 Gold (10 nm) conjugated goat anti-mouse IgG로서 습기 상자에서 1시간 동안 처리하여 시료에 금 입자를 표지 하였다. 시료는 PBSB에 세척하였고 1% 글루타르알데히드와 0.2% OsO<sub>4</sub>에 각각 1분 동안 처리하였으며 각 단계에서 증류수로 여러 번 세척하였다. 절편은 포화 uranyl acetate로 염색하였다. 한편 포화 uranyl acetate 염색으로 금 입자를 잘 관찰할 수 있었으나 때로 핵질의 전자 농도로 인하여 음 염색(negative staining)이 필요할 경우가 있었다. 음 염색은 금 입자 표지 후 2% PTA (phosphotungstic acid, pH 7.2) 수용액에 처리하고 여러 번 증류수에 세척하였다. Jeol 1010B 전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

개불 정자와 정세포는 그 감수 분열 시기가 알려지지 않았으므로 서술의 편의상 침체, 중심소체, 편모가 형성되었으나 아직 sperm ball에 부착된 것을 정세포(spermatid)로, 그리고 sperm ball로부터 분리되어 정소 강(testis lumen)에서 관찰되는 것을 성숙 정자로 하였다. 이와 같은 성숙 정자와 정세포의 차이는 미세구조 관찰로서 구분할 수 있었다. 대조군에서 보면 성숙 정자의 핵은 비교적 작고(~3 μm) 핵질이 균질성이고 비교적 작고 소수의 nuclear vacuole를 포함하나(Fig. 1), 정세포의 핵은 보다 크고(~4 μm) 핵질은 과립성이며 다수의 nuclear vacuole을 갖는다(Fig. 2). 정자와 정세포의 핵은 전면이 함입된 구형이고 이 함입부에 침체가 존재한다. 정소 강(testis lumen)에서

추출한 성숙 정자의 침체는 외곽의 물질농도가 높은 환형 혹은 판형이며 perinuclear theca로서 핵과 구별된다(Figs. 1, 2). 침체의 내부는 침체 간격(acrosomal gap)을 형성하고 있으나 그 형태는 전자현미경으로 관찰할 때 일정하지 않았으며 정자 발생시기와 재료 취급 과정에 원인이 있는 것으로 볼 수 있었다. 핵 뒤에 nuclear fossa가 형성되고 약간의 세포질과 미토콘드리아를 포함하며 중심소체는 nuclear fossa 중앙부에 위치한다.

침체돌기 유도실험 혹은 인공수정 재료에서도 침체돌기를 관찰하기 어려웠다(Fig. 3). Fig. 3에서 보면 정자가 난자의 표층에 결합하고 있으나 침체물질의 일부가 확산되는 것 외에 침체돌기는 보이지 않았다. 침체간격과 외곽 침체 전체를 볼 수 있는 이 절편의 절단면은 정자의 중앙을 통과하는 것으로 보이나 침체돌기 또는 그 일부를 관찰할 수 없었고 난표층에 결합하고 있으나 침체물질이 아직 소진되지 않는 것으로 관찰된다.

정자가 표층을 통과하여 난세포질과 접촉한 침체 외곽의 면모도 미세구조에서 볼 때 상당량의 물질이 아직 침체에 잔존하는 것으로 보이며 표층에 접촉했을 때와 같이 침체돌기가 관찰되지 않았으며 침체의 전체 면이 난세포질과 접촉하는 것으로 볼 수 있었다(Fig. 4).

초박절편을 제작한 후 1차 항체인 아메바 항-액틴으로 처리하고 이를 2차 항체인 항-생쥐 IgG-금 입자(10 nm)로 표지한 결과에서는 정자 핵 또는 핵질에서 수많은 금 입자들이 관찰되었고 항원-항체 특이 반응이 있는 것으로 볼 수 있었다(Fig. 5). 그러나 전자 광학의 관점에서 볼 때 물질 농도가 높은 침체 외곽에 부착된 금 입자는 관찰할 수 없었다. 금 입자의 수 또는 농도로 판단한 항원-항체 특이 반응은 핵 및 핵질에 있는 것으로 볼 수 있었다.

금 입자는 핵이 작고 핵질이 균질성인 정자(Fig. 5) 보다는 핵이 크고 과립형이며 다수의 nuclear vacuole을 포함하는 정세포(Fig. 6)에서 다소 적게 관찰되는 경향이 있었다. 금 입자의 수에서 다소 적었으나 정세포 핵질에 결합한 금 입자는 특이 반응의 결과 볼 수 있었다. 정자 및 정세포 핵질에 비교해서는 극히 적은 수의 금 입자가 침체에 결합하였다. 정세포의

nuclear vacuole은 정자에서 보다 크고 그 수도 많은 것으로 보인다.

핵질과 침체의 미세구조 및 결합한 금 입자의 분포를 볼 때 정자와 정세포의 중간단계로 관찰되는 정세포를 자주 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 결합한 금 입자를 좀 더 명확하게 관찰하고자 음 염색한 이 정세포의 핵질은 균질성인 부분(흰 별표)과 과립성 또는 이질성인 부분으로 구분될 수 있었으며 금 입자들은 주로 과립성 핵질에 결합한 것으로 관찰된다.

성숙 정자 침체의 전면을 횡단한 절편에서 보던 핵질과 침체 및 침체간격에 부착하는 금 입자 농도 차이를 잘 관찰할 수 있다(Fig. 8). 침체의 외곽보다는 내부의 침체 간격에 소수의 금 입자들이 부착하였으나 균질성인 핵질에는 많은 금 입자들이 결합하는 것으로 볼 수 있었다.

## 고 찰

수정 시 침체돌기를 형성하는 다른 동물 및 계통 발생의 관점에서 개불과 연관된 성계(Schakmann et al., 1978; SeGall & Lennarz, 1979)에서 밝혀진 바와 같이 정자 침체돌기의 신장은 침체반응의 형태적 증거가 될 수 있으며, 그 내용은 정자에 존재하던 G-액틴의 부분 농도에 의한 원심성 중합반응과 자기조립(Fath & Burgess, 1994)에 의한 actomere의 형성(Inoue, 1982)으로 볼 수 있으며 액틴의 중합 반응은  $Ca^{++}$ 의 농도변화(Brundage et al., 1991; Hahn et al., 1992) 및 pH의 변화(Tioney & Inoue, 1985) 등 정자 활성화 요인에 의하는 것으로 아러지고 있다. 그러나 정자에서 G-액틴의 위치는 종(種)에 따라 달라서 성계에서는 anterior nuclear fossa(Tilney & Inoue, 1985), 사람이나 *Macaca fascicularis*에서는 fibrous sheath(Escalier, 1997), 생쥐, 쥐, 원숭이, 햄스터 등은 subacrosomal space(Fouquet, 1990; Prigent, 1993), 토끼(Flaherty et al., 1988; Fouquet, 1989) 등에서는 perinuclear fossa로 보고되므로서 침체반응에 참여하는 액틴의 분포는 종 특이성이 있는 것으로 알려지고 있다(Fouquet, 1992).

형태적으로 잘 발달한 침체가 있음에도 수정 시 분명한 침체반응을 보이지 않는 개불 정자에서 액틴

의 위치를 관찰하고 그 기능을 이해하기 위한 본 연구의 아메바 항-액틴 처리와 이 항체를 항-생쥐 IgG-금 입자로 표지한 결과는 침체에서 금 입자를 관찰할 수 없었거나 혹은 침체 간격(acrosomal gap)에서 적은 수의 금 입자를 볼 수 있었으나 이를 항원-항체 특이 반응의 결과로 볼 수는 없었다. 수많은 금 입자들이 결합하여 항원-항체 특이 반응이라고 생각되는 것은 정자 혹은 정세포 핵질(nuclear matrices)이었다. 위와 같은 반응은 침체돌기 유도실험 즉, 난자 파편과 정자를 혼합한 재료와 인공수정으로 활성화된 정자에서도 매우 유사하였으며 침체를 관찰하기 어렵거나 혹은 형태적으로 "혼적 침체돌기(rudimentary acrosome)" 혹은 비기능적 침체돌기가 형성되는 것으로 관찰된 바 있다(Kwon et al., 2000). 본 연구의 아메바 항-액틴은 G-액틴 혹은 G-액틴 oligomer에 결합(Prigent, 1993)하므로 침체돌기 형성 물질인 G-액틴이 존재하는 곳은 개불 정자 및 정세포의 핵질이고 침체에는 침체반응을 수행할 수 없는 소량 혹은 F-액틴 등 다른 위상(phase)의 액틴이 존재할 수 있을 것으로 사료되었다. 항-생쥐 IgG-금 입자는 절편 부각(etching)에 사용한 용액의 농도와 시간에 따라 다소 다르지만 금 입자의 농도가  $1.17 \times 10^{12}/\text{ml}$ 일 때 4 ng의 항원을 인식할 수 있으므로(Jahn et al., 1984; Piperno & Fuller, 1985) 다소의 양적 관계를 설명하는 것이 가능할 수도 있으나 본 연구 수행 중 F-액틴에 결합하는 FITC-phalloidin 처리 결과는 핵질에서 보다 침체에서 강한 형광성을 보였으므로(unpublished data) 그 위상이 G-액틴이 아닌 것으로 볼 수 있었다. 이는 G-액틴의 원심성 중합 반응과 자기조립으로 침체돌기를 형성하는 경우와는 상이한 것으로서 개불 정자에서 형태적으로 잘 발달한 침체가 있음에도 미약한 혹은 비기능적 침체돌기의 출현을 이해할 수 있는 것으로 생각하였다.

면역 금입자들이 개불 정자와 정세포 핵질에 표지된다는 사실과 보다 많은 수의 금 입자들이 정세포 보다는 정자 핵질에서 관찰된 결과는 개불 정자 발생 단계에서 수행되는 액틴 위상의 변화인 것으로 사료되었다. 액틴은 세포골격 성분의 하나이고 중합형 액틴의 탈중합 반응으로 재배열이 가능한 물질이며 세포 형태형성에 관여하는 사상 단백질이다(Coo-

per, 1991). 동물의 정세포가 형태 변화를 거쳐 정자로 발생하는 과정은 핵의 형태가 유선형으로 변하는 것과 동시에 응축되는 것으로 이해할 수 있고 이를 주도하는 외적 요인으로는 닭 등 조류에서 manchette 미세소관이 보고된 바 있으나 (McIntosh & Porter, 1967) 쥐, 생쥐, 토끼, 원숭이 (Fouquet, 1992), 그리고 사람의 정자에서 manchette 미세소관은 equatorial plate 후반부에만 일시적으로 출현할 뿐 아니라 전반부에서 핵 응축을 주도하는 것은 섬유성 액틴의 탈중합 반응인 것으로 보고된 바 있다 (Courtot et al., 1994). 또한 *Scorpion*과 같이 equatorial plate 후반부에도 manchette 미세소관이 관찰되지 않는 경우에는 핵 외적 요인에 의한 형태변화를 설명하기 어려우며 (Philips, 1974) 이와 같은 예는 핵이 유선형이 아닌 *Thyone* (Inoue, 1982), *Crane fly* (Strauch, 1986), *Nematode* (Italiano et al., 1999) 등의 정자에서 보고된 바 있고 이들 동물에서 핵 형태변화의 내용은 핵 응축이며 그 원인은 핵질의 섬유성 액틴의 탈중합 반응인 것으로 알려지고 있다. 개불의 경우에는 항- $\alpha$ ,  $\beta$ -튜블린-금 입자 표지실험에서 정세포 핵 주위에서 미세소관이 관찰된 바 있으나 manchette를 형성하지는 않았으며 (Shin, 1998) 정세포 및 성숙 정자 핵의 형태도 유선형이 아니므로 핵 형태변화는 체적 감소가 주요 내용인 것으로 볼 수 있는 경우이었다. 체적 감소의 미세구조적 증거는 정세포에서 다수의 nuclear vacuole과 과립형 핵질이 관찰된 반면 성숙 정자에서는 nuclear vacuole 수와 크기가 현저히 적었으며 핵질도 비교적 균질성이라는 관찰 결과일 수 있을 것으로 생각하였다. 실제로 정자 핵의 크기( $\sim 3 \mu\text{m}$ )는 정세포의 크기( $\sim 4 \mu\text{m}$ )와 차이가 있으며 개불 정자 발생 단계에 위의 미세구조 변화에 의해 핵이 응축될 수 있다고 사료되었다.

한편, 세포 또는 핵 체적의 증감은 보다 궁극적으로 세포골격 또는 세포막과 연관되어 설명되어야 하며 이는 액틴 미세섬유와 막성성분의 물리적 상호작용을 의미한다 (Theriot & Mitchison, 1992). 따라서 개불 보다 크고 nuclear vacuole 다수인 정세포 F-액틴의 탈중합 반응으로 핵이 응축될 수 있다면 이는 액틴 미세섬유와 핵막의 상호작용일 것으로 사료된다. 막성성분의 경도(rigidity)는 그 자체가 세포형태 변

화를 결정하거나 체적 증감 (Egile et al., 1999; Mallavarapu & Mitchison, 1999), 또는 이와 유사한 막성성분의 변화인 세포운동 (Adams et al., 1990)을 주도할 수는 없으나 (Soyer-Gobillard et al., 1996; Holly & Blumer, 1999) 경도(rigidity)가  $7.3 \times 10^{-26} \text{Nm}^2$ 인 액틴 (Gittes et al., 1993)의 극성과 액틴, 미세소관 및 구조 미오신과의 상호작용 또는 망상구조 (Hoey & Gavin, 1992)형성에 의한 기능적 상승효과 (synergy effects)로 증가된 vectorial 에너지가 감소하거나 없다면 원형을 회복할 수는 있으며 (Verkovsky & Borisy, 1993), 부분적 vectorial 에너지의 감소는 막성 성분이 retrograde flow의 원인으로 이해되고 있다 (Lee et al., 1993; Heath & Holifield, 1991). 본 연구에서 보면 보다 많은 금 입자가 정자 핵질에서 관찰되었고 하나의 정세포 핵질에서도 분포가 편중되는 경우도 있었으며 (Fig. 7), 이 시기에 정세포 핵 체적이 감소되는 것으로 관찰된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 이들 사건의 동시성과 미세구조 변화에 근거하여 정세포 핵 F-액틴의 탈 중합 반응이 정자 핵에서 G-액틴 혹은 G-액틴 oligomer의 증가와 정세포 핵 응축의 원인인 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

- Adams AEM, Johnson DI, Longnecker RM, Slot BF, Pringle JR: CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 111 : 131-142, 1990.
- Brundage RA, Forgaty KA, Tuft RA: Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophile. *Science* 254 : 703, 1991.
- Cooper JA: The role of actin polymerization in cell motility. *Ann Rev Physiol* 53 : 585-605, 1991.
- Courtot AM, Feinberg JM, Schoevaert DA, Rainteau DP, Weinman SJ: Calmodulin during human sperm incorporation into hamster oocyte: an immunogold electron microscope study. *Mol Reprod Dev* 38 (2) : 170-7, 1994.
- De May JR: The preparation of immunoglobulin gold conjugated (IGS reagents) and their use as markers for light and electron microscopic immunocytochemistry. In "Im-

- munohistochemistry" Cuello AC ed IBRO Wiley pp. 347–372, 1983.
- Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Li D, Pantaloni P, Sansonetti J, Cakier MF: Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin based motility *J Cell Biol* 146 : 1319–1332, 1999.
- Escalier D: Immunohistochemical characterization of a human sperm fibrous sheath protein, its developmental expression pattern, and morphogenetic relationships with actin. *J Histochem Cytochem* 45(7) : 909–22, 1997.
- Fath KR, Burgess DR: Membrane motility dedicated by unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* 6 : 131–135, 1994.
- Flaherty SP, Winfrey VP, Olson GE: Localization of actin in human, bull, rabbit, and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat Rec* 221 : 599–610, 1988.
- Fouquet JP: Immunogold distribution of actin during spermiogenesis in the normal rabbit and after experimental cryptorchidism. *Gamete Res.* 24(3) : 281–90, 1989.
- Fouquet JP: Immunoelectron microscopic distribution of actin in hamster spermatids and epididymal, capacitated and acrosome reacted spermatozoa. *Tissue Cell* 22(3) : 291–300, 1990.
- Fouquet JP: Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: fact or artifact? *Microsc Res Tech.* 20(3) : 251–8, 1992.
- Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J: Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 120 : 923–934, 1993.
- Hahn K, DeBiasio R, Taylor DL: Pattern of elevated free calcium and calmodulin activation in living cell. *Science* 359, 736–738, 1992.
- Heath JP, Holifield BF: Cell locomotion: New research tests on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motil Cytoskeleton* 18 : 245–257, 1991.
- Hoey JG, Gavin RH: Localization of actin in the *Tetrahymena* basal body-cage complex. *J Cell Sci* 103 : 629–641, 1992.
- Holly SP, Blumer KJ: PAK family kinase regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 147 : 845–856, 1999.
- Inoue S: Acrosomal reaction of *Thyone* sperm. I. Changes in the sperm head visualized by high resolution video microscope. *J Cell Biol* 93 : 812–819, 1982.
- Italiano JE, Stewart M, Robert TM: Localized depolymerization of the major sperm protein cytoskeleton correlates with the forward movement of the cell body in the amoeboid movement of Nematode sperm. *J Cell Biol* 146 : 1087–1095, 1999.
- Jahn R, Schieber W, Greengard P: A quantitative dot immunoblotting assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. *PNAC, USA*, 81 : 1684–1687, 1984.
- Kim WJ, Choi JS, Shin KS: Study on the cleavage pattern and the morphogenesis in fertilized egg of *Urechis unicinctus*. *Nat. Sci. Soonchunhyang Univ* 267–274, 1995. (Korean).
- Kwon HJ, Kim WJ, Shin KS: Structural changes of *Urechis unicinctus* oocytes after the artificial insemination. *Nat. Sci. Soonchunhyang Univ* 17 : 1083–1089, 1994. (Korean)
- Kwon HJ, Shin KS, Kim WJ: Fine structural investigations of fertilization envelopes and acrosomal reaction in *Urechis unicinctus*. *Korean J Electron Microscopy* 30 : 61–72, 2000. (Korean).
- Lee, JA, Ishihara A, Theriot, LA, Jacobson K: Principles of locomotion for simple shaped cell. *Nature*, 362 : 167–171, 1993.
- Mallavarapu A, Mitchison T: Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium Tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol* 146 : 1097–1106, 1999.
- McIntosh, JR, and KR Poter: Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J Cell Biol* 35 : 153–173, 1967.
- Philips DM: Nuclear shaping in the absence of microtubules in scorpion spermatids. *J Cell Biol* 62 : 911–917, 1974.
- Piperno G, Fuller MT: Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of  $\alpha$ -tubulin recognized the antigen in cilia and flagella from a variety of organism. *J Cell Biol* 101 : 2085–2994, 1985.
- Prigent Y: Immunoelectron microscopic distribution of actin in the spermatids and epididymal spermatozoa of the mouse. *Acta Anat (Basel)*. 147 (3) : 133–9, 1993.
- Schakmann RW, Christen WR, Sapiro BM: The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. Ion requirement and movements. *Dev Biol* 65 : 483–495, 1978.
- SeGall GK, Lennarz WJ: Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin egg responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev Biol* 71 : 33

- 48, 1979.
- Shin KS: An artificial insemination of *Urechis unicinctus* I. J Soonchunhyang Univ. 15: 889-897, 1992. (Korean)
- Shin, KS: The fine structure of the sperm ball and sperm of *Urechis unicinctus* and immunogold localization of  $\alpha$ -tubulin. Korean J Electron Microscopy 28: 193-205, 1998. (Korean)
- Soyer-Gobillard MO, Ausseil J, Geraud ML: Nuclear and cytoplasmic actin in dinoflagellates. Biol Cell 87 (1-2): 17-35, 1996.
- Strauch AR: Biochemical analysis of actin in crane fly gonial cells: Evidence for actin in spermatocyte but not sperm. J Cell Biol 86: 315-325, 1986.
- Theriot JA, Mitchison. TJ: The rate of actin based motility of intracellular *Listeria monogenes* equals the rate of actin polymerization. Nature 357: 257-260, 1992.
- Tilney LG, Inoue S: Acrosomal Reaction of the *Thyone* Sperm. III. The Relationship between Actin Assembly and Water Influx during the Extension of the Acrosomal Process. J Cell Biol 100: 1273-1283, 1985.
- Verkovsky AB, Borisy GG: Nonsarcomeric mode of myosin II organization in the fibroblast lamellum. J Cell Biol 123: 637-652, 1993.

#### < 국문 초록 >

1. 아메바 항-액틴의 Ag-Ab 반응과 이를 항-생쥐 IgG-금 입자로 표지한 결과는 주로 정세 포 및 정자의 핵질에 특이적으로 표지되었고 침체에서는 그 반응을 볼 수 없었다.

2. 표지된 항-액틴 금 입자로 볼 때 정자 핵질의 G-액틴 또는 G-actin oligomer는 정세포의 F-액틴에서 유래되는 것으로 사료된다.

3. 침체의 액틴은 주로 F-액틴으로 침체돌기 형성에 참여하지 않는 위상인 것으로 관찰 된다.

4. 미세구조의 변화, 정세포 체적의 감소, 정세포 및 정자 핵에 표지되는 금 입자의 증가와 이들 현상이 나타나는 동시성으로 볼 때 정세포 핵의 형태변화의 내용은 응축이고 이는 F-actin의 탈중합 반응에 의한 G-액틴의 생성이 원인일 것으로 사료된다.

## FIGURE LEGENDS

**A**, Acrosome; **Ag**, Acrosomal gap; **C**, Centriole; **E**, Egg; **F**, Flagella; **M**, Mitochondrion; **N**, Nucleus; **Nv**, nuclear vacuole; **S**, Sperm; **SC**, Surface coat of egg

- Fig. 1.** A mature spermatozoon with homogeneous nuclear matrices and acrosome. The acrosomal contents have been discharged, but the formation of acrosomal process is not distinct. The nucleus is condensed compared with spermatid (fig. 2) and nuclear vacuoles are reduced in number and size. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 2.** A spermatid with granular nuclear matrices with its nuclear vacuoles. The contents of the acrosome look like not yet be discharged so that the massive and gradient shape can be maintained at this developmental stage. In the acrosomal gap, a fibrous materials can be seen. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 3.** An artificial insemination of *Urechis* sperm and egg. The sperm contacts on surface coat of the egg, but there is no acrosomal process to be seen in this median section. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 4.** A spermatozoon has been penetrated the surface coat of the egg and contacts with egg cytoplasm. The nucleus is condensed with relative homogeneous nuclear matrices (S. fig. 1). Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 5.** Anti-actin and anti-actin-gold (10 nm) labeled nuclear matrices of a spermatozoon. Since the anti-actin binds to G-actin, it reveals the G-actin is a component of the nuclear matrices. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 6.** Anti-actin and anti-actin-gold (10 nm) labeled nuclear matrices of the spermatid. The pattern of incorporated of immunogold particles are similar as seen on the sperm head, but less number of gold particles can be observed on the granular nuclear matrices of spermatids head. Much more nuclear vacuoles are to be seen in the granular matrices of the nucleus. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 7.** An intermediate stage of nuclear condensation of *Urechis* spermatogenic cells. The section is stained negatively with 2% PTA. However, the density and content of acrosome at this stage are intermediate in comparison with the acrosome of mature sperm (fig. 1) and with that of spermatid (fig. 2). A few gold particles can be seen at the relatively homogeneous portion of nuclear matrices (white asterisk), while much more gold particles are to be seen at the less dense and heterogeneous portion. The tendency of incorporation of gold particles may imply that there are a partial condensation of the nuclear matrices. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 8.** A slightly oblique section through the acrosome of a spermatozoon. A few gold particles are bound to acrosomal gap, while much more particles are to be observed in the nuclear matrices. The incorporated gold particles in the acrosomal gap may not be the specific binding and the actin can be a another actin phase, such as F-actin. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .





