

## *Urechis unicinctus* 수정막과 침체반응에 대한 미세구조적 관찰

권혁제, 신길상\*, 김완중  
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

### Fine Structural Investigations of Fertilization Envelopes and Acrosomal Reaction in *Urechis unicinctus*

Hyuk-Jae Kwon, Kil-Sang Shin\* and Wan-Jong Kim  
Department of Life Science, College of Natural Science  
Soonchunhyang University, Asan, Choongnam, 336-745, Korea  
(Received January 14, 2000)

#### ABSTRACT

Three fertilization envelopes (FE) have been observed after the artificial insemination of *U. unicinctus* oocytes. The substances of the first fertilization envelope, which is an effective barrier against excessive sperm, come mainly from the surface coat of the oocyte. The secretions of the cortical granules take part in formation of the 2nd fertilization envelope. Histologically, the 3rd fertilization envelope is not amorphous as seen under light microscope, but contains numerous particles under electron microscope, which would be contributed to harden the envelope by 60 min after the fertilization. With the substantial similarity between the 1st fertilization envelope and the surface coat of the oocyte, and the coincidence of retraction of microvilli and the formation of the 1st fertilization envelope, it is suggested that the microvilli contain the sperm receptors in *U. unicinctus*.

Some granular substances from the distal part of the acrosome diffuse on the surface coat of the oocyte while the acrosomal tubules penetrate into the surface coat. The acrosomal tubules arise from the proximal part of the acrosome and pass through the acrosomal lumen.

**Key words** : Acrosomal tubule, Cortical granule, Fertilization envelope, Ultrastructure

#### 서 론

양성생식 생물에서 수정은 정자와 난자가 결합하고

전핵들이 융합하여 접합자를 생산하는 일련의 복합 과정의 결과라고 할 수 있다. 수정에 관한 많은 연구들이 형태학(Gold-Somero & Holland, 1975; Elison & Manes, 1978; Iwamatsu & Ohta, 1978), 조직화학(Sato

\*Correspondence should be addressed to Dr. Kil-Sang Shin, Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam, 336-745, Korea. Ph: (0418) 530-1252, FAX: (0418) 530-1256, E-mail: Shinks@asan.sch.ac.kr  
Copyright © 1999 Korean Society of Electron Microscopy

& Osanai, 1980; Sato & Osanai, 1986), 생화학과 분자 생물학적 (Gold-Somero & Stephano, 1991; Giusti et al., 1997) 방법론으로 시도된 바 있으나 아직 일반적인 기준을 제시하는데는 어려움이 있으며, 이는 여러 가지 이유 외에도 수정에 관여하는 종 특이성에 원인이 있는 것으로 알려지고 있다.

지금까지 여러 해양 무척추동물과 포유류의 예에서 알려진 바에 의하면 수정은 난자와 정자가 접촉하는 1차 결합과 침체반응을 내용으로 하는 2차 결합 (Epel & Vaquier, 1978; Monary & Rosati, 1983)으로 구별할 수 있다. 침체반응으로 인한 난세포의 변화로는 막전위의 변화 (Eddy & Shapiro, 1976; Begg et al., 1982), 피질과립 (cortical granule)의 분비 (Paul & Gold-Somero, 1976; Epel & Vaquier, 1978), 체적증가 (Eddy & Shapiro, 1976; Scheroder, 1979)와 강도변화 (Linhart & Kudo, 1997) 등이 보고된 바 있다. 이런 일련의 사건은 수정 초기 수 분내에 일어나며 정자 침입에 의한 난세포 내, 외부의 변화일 뿐 아니라 정자와 난자의 물질적 상호작용이라고 할 수 있으며 (Tyler, 1965; Iwamatsu & Ohta, 1978) 이를 억제하는 것은 수정을 억제하게 되는 한편 다수정을 유도하는데 관여할 수도 있다 (SeGall & Lennarz, 1979).

종 특이성에 따른 수정 초기작용은 정자와 난자 표면물질의 분포와 구조의 특징에 의해서 이루어지는 것이지만 (Wyrick et al., 1974), 알려진 예에서 물질의 분포 및 구조와 연관된 정자-난자의 최초 접촉에 관한 증거는 논리적 증거보다 풍부하지 못한 것으로 생각된다. 이러한 이유는 위의 종 특이성 외에도 짧은 정자-난자의 접촉 시간과 이에 따른 실험조건, 그리고 정자-난자의 크기 비율에 따른 관찰 시야의 제한 등에 있으며 재료 선택과도 연관된 것으로 생각할 수 있다.

인공 수정한 개불 (*U. unicinctus*)의 난자를 재료로 한 본 연구에서는 수정 초기반응에서 1차 수정막이 형성되고, 이후 피질과립 반응에 의해 2, 3차 수정막이 형성되는 것이 관찰되었으며 그 결과 미세용모에 정자 수용체가 존재하는 것으로 추측할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 인공 수정 후 여러 단계의 수정막 형성에 따른 물질적 기원과 침체반응 및 이에 연관된 구조 변화에 대하여 보고하고자 하며 미세용

모의 정자 수용체에 대하여 고찰하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험의 재료인 개불은 순환적 생식 주기에 따라 성숙 정자와 난자가 각각 정소와 난소에 채워지는 시기인 1997년 5월과 6월 사이에 충남 서산군 몽산포 일대의 해안 개펄 층에서 채집한 것을 사용하거나 또는 채집 후 실험실에서 15~17°C의 수온을 유지하고 플랑크톤 먹이를 공급하며 사육한 것을 사용하였다. 재료를 사육한 경우에 사육한 생식세포는 채집 당시의 활성과 형태적 특징을 보이는 것을 선별하여 사용하였다. 이 동물의 외부 형태로는 자웅의 구별이 어려우나 생식주기에는 서로 다른 색의 정소와 난소가 발달하므로 자웅의 구별이 용이하다. 정소와 난소가 있는 구문부로 부터 채취하여 얻는 정자와 난자의 양은 각각 한 개체로부터 최고 15 ml에 이른다.

### 2. 인공수정

채집한 정소 및 난소는 milipore (0.45  $\mu$ m)로 여과한 자연 해수에 세척하여 혈구 및 기타 불순물을 제거하였다. 인공수정시 여러 실험군사이의 동시성을 고려하여 자웅 각각 1개체에서만 얻은 정자 및 난자만을 사용하였다.

정소로부터 채취한 직후의 정자는 활성이 미약하고 해수와 접촉한 후 활성이 생긴다. 따라서 정자는 해수와 접촉시키고 그 활성을 확인한 후 사용하였다. 난자는 여과된 해수에 처리하여 침전하는 난자만을 선별하였고 또한 성숙 난자 (100~150  $\mu$ m)를 얻기 위해 나일론 망 (nylon mesh, 100  $\mu$ m)에 여과되지 않는 난자만을 사용하였다. 인공수정은 수정의 여러 단계를 관찰하기 위해서 자연해수의 염분도 보다 다소 높은 25‰, 그리고 다소 낮은 온도인 16°C의 milipore 여과 해수를 사용하였으며, 난자:해수=1:100으로 희석하고, 정자:난자=1:500이 되도록 조절하였다. 인공 수정한 후 10분이 경과하면 광학현미경으로 관찰한 정자의 활성이 급격히 감소하였으므로 해수를 교환하여 활성이 없는 과잉 정자를 제거하였다.

실험군에 따른 수정과 수정시간은 광학현미경으로 확인하였고, 전자현미경 시료로 사용하였다.

### 3. 전자현미경 시료제작

수정된 난자는 Elison & Manes (1978)과 Gold-Somero & Holland (1975)의 보고와 같이 형성중의 수정막으로 인하여 고정에 어려움이 있었으므로 다음과 같은 방법으로 고정하였다.

대조군인 미수정란과 수정란인 실험군은 모두 인산완충용액(0.1 M, pH 7.4)으로 희석한 2% 포르말린에 1차로 처리하고, 10분 후에 고정액을 교환하였으며 4°C에서 약 14일간 전고정하였다. 재료는 인산완충액에 희석한 1% 오스미움 산에서 각각 2시간 후고정하였고 같은 완충액으로 1시간씩 2회 수세 하였다. 이후 재료는 알코올 농도 상승순에 따라 각 10분간 탈수하였으며 propylene oxide와 Epon 812 혼합물에서 15분간 2회 치환하고 Epon 812에 포매하였다. 박절편(1 μm)은 toluidine blue로 염색하였고, 70~90 μm의 초박절편은 uranyl acetate와 lead citrate에 염색하고 JEOL 1010B 전자현미경으로 80KV하에서 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 광학현미경 관찰

정소에서 채취한 직후의 개불 정자는 점도가 높은 응집체였으며 운동성이 없으나, 소량의 해수와 접촉하면 강한 운동성을 갖는다.

난자는 체강에 자유세포로 존재하는 것과 난소에서 축적된 성숙 난자들이 있으며, 난소의 근위부 혹은 원위부에 따라서 난자의 성숙도가 다른 것으로 관찰되었다. 실험에 사용한 것은 주로 난소의 체벽, 즉 소공 근위부에서 채취한 것을 사용하였으며 해수에 대한 밀도에 의해 선별하고 나일론 망(nylon mesh)으로 여과하여 100 μm 이상의 성숙 난자만 사용하였다. 이 난자들의 세포막은 만입(invagination)되고 핵막은 함입(indentation)되어 있으나, 이는 난자의 밀도와 해수 농도에 의존적이었으므로, 해수로 처리하여 구형을 회복한 난자들을 사용하였다.

인공수정 2분경 수정란에 수정구를 형성하는 것을

관찰할 수 있었다. 수정구는 수정 3~5분 경에 전체 난세포 표면으로 확장되고 두께가 증가하여 수정막을 형성하였으며, 약 10분 후에 수정막은 14~16 μm의 두께로 발달하고 수정막을 완성하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1). 수정 5~10분경 수정막 내부에는 직경 8 μm의 극체가 관찰된다(Fig. 2). 한편 수정막 외부에는 형태적으로 활성이 약한 것으로 보이는 다수의 정자를 볼 수 있었으나 약 30분 후에 그 수는 현저하게 감소하는 것으로 관찰되었다.

### 2. 전자현미경 관찰

개불 난자를 인공 수정한 후, 침체반응과 연관된 구조의 변화와 수정막의 형성, 그리고 난세포질 속의 정자 핵의 구조 변화를 주로 관찰하였다. 수정막 형성은 피질과립 분비에 따른 그 수의 감소와 미세구조 변화를 내용으로 하고 있으며 미세용모의 감소와 형태변화를 수반하고 있다.

#### 1) 미수정란

개불 미수정란의 난세포막 외부에는 두께 2~3 μm의 난외막(perivitelline membrane)을 갖는다. 난외막은 두께 0.7 μm의 표층(surface coat)과 1~2 μm의 위란강(perivitelline space)으로 구분할 수 있다. 미수정란의 최외곽인 표층은 비교적 균질한 입자성 물질로 형성되어 있으나 이들 입자성 물질의 분포로 인하여 표층 내, 외는 다소 불규칙하게 보인다. 표층과 난세포막 사이인 위란강(perivitelline space)은 파상의 난세포막에서 돌출한 미세용모(1~2 μm)로 인하여 그 두께가 균일하지 않은 것으로 보인다. 미세용모는 때로 난세포 표면으로부터 수직으로 위란강에 돌출하나 때로 중간에서 굴곡된 것과 표층의 외부로 돌출한 것 등을 관찰할 수 있었다. 직경 1~2 μm의 다소 불규칙한 구형의 피질과립(cortical granule)은 난세포 표층에서 주로 볼 수 있으며, 내부의 균질한 입자성의 물질은 단일 막으로 둘러싸인 것으로 관찰된다. 한편, 난 세포질 내부에서는 염색성으로 본 포화지질이 관찰된다(Fig. 3).

#### 2) 정자-난자 1차 결합

##### (1) 침체반응

정자와 난자가 근접하여 침체반응을 볼 수 있는

절편에서는 수정시의 정자 구조를 관찰할 수 있었다. 정자 머리 부위의 세포막은 파상이며 정자 머리는 perinuclear theca에 의해 침체와 핵으로 구분된다. 핵은 전반부가 함입된 구형이고, 막성구조로 둘러싸인 침체는 핵의 이 함입부에서 볼 수 있었다. 침체(500 nm × 2 μm)는 중앙에 직경 200 nm의 침체간격에 의해 두 부분으로 나뉘어져 있으며 전체적으로는 원반형 혹은 환형으로 관찰된다(Fig. 4). 정자가 난자에 근접하면 때로 침체를 구성하는 물질은 농도 구배를 형성하는 것을 볼 수 있다(Fig. 5). 중편을 구성하는 주요 구조는 미토콘드리아와 기부 및 단부 중심소체이며 미토콘드리아의 크리스테는 관상형(tubular type)인 것으로 관찰되었다. 중심체들은 미토콘드리아와 핵사이의 간격인 posterior nuclear fossa(300 × 580 × 600 nm)에서 볼 수 있다(Figs. 4, 5).

전자현미경 관찰에서 관찰된 침체반응은 인공수정 1~2분 경으로, 이때 두께 5~6 μm의 수정막이 형성된다. 이 수정막 형성에는 아직 피질과립 물질이 참여하지 않는 것으로 관찰되었으므로 본 연구에서는 이를 "1차 수정막"이라고 하였다. 개별의 최종 수정막 형성에는 피질과립이 분비되고 여러 단계를 거쳐서 형성되며, 피질과립의 분비물이 섬유화하는 미세구조적 증거가 있는 등 1차 수정막과는 물질적 근원과 형성과정이 다소 상이하므로, 이를 "2차 수정막"이라고 하였다(아래 참조).

정자가 난자에 근접하면 정자의 침체간격으로부터 1차 수정막내로 침체돌기가 신장되며(0.4 μm) 침체의 전면(폭: 0.8 μm)이 1차 수정막 외층과 접촉한다. 이때 침체를 구성하는 물질의 농도 혹은 밀도는 약해지고 농도 구배도 점차 볼 수 없게 되며 침체간격과 그 안쪽으로부터 침체 미세소관(acrosomal tubule)이 발달하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이때 침체 미세소관의 기부는 침체 내막에 밀착하고 있다. 이때 침체 미세소관의 전단부인 1차 수정막 내부에는 아직 그 근원과 기능이 알려지지 않았으나 침체 미세소관의 신장과 관련된 구조로 보이는 구형 막성구조(0.2 μm)가 관찰된다(Fig. 5). 침체가 접촉한 1차 수정막의 외층은 약간 용기되어서 광학현미경에서 수정구로 보이며, 이의 가장자리는 농도로 보아서 침체로부터 유래되는 물질로 보이는 과립상 물질이 난 표

층을 향해 확산되는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 5).

### (2) 1차 수정막

위에서와 같이 본 연구의 "1차 수정막"은 정자-난자 접촉 직후부터 피질과립이 참여하기 전까지의 위관강(perivitelline space)의 변화로 형성되는 난외막이다. 1차 수정막은 다정자증을 방지하는 실질 기능을 갖는 것으로 관찰되었으나, 문헌상의 명칭을 찾아 볼 수 없었으므로, 본 연구에서는 서술의 편의로서 또는 그 기능으로 보아서 정자 접촉 후 형성되는 두께 5~6 μm의 난외막을 1차 수정막이라고 하였으며, 광학현미경적 구조인 수정구도 포함하고 있다(고찰 참조).

1차 수정막은 표층(0.5 μm)과 위관강 등 난외막은 확장되고, 그 내부에는 크기가 일정하지 않은 막성구형 구조가 출현하며, 미세용모들이 수축하는 것이 특징적으로 관찰되었다(Fig. 6). 1차 수정막의 표층은 미수정난 표층(surface coat)의 입자상 물질이 안쪽으로 확산해서 형성되는 것으로 보인다. 1차 수정막 형성시 난자 피질부의 피질과립들은 난 세포막에 보다 근접하는 것을 볼 수 있다(Fig. 6).

### (3) 2차 수정막

수정 3~5분에는 피질과립의 막성 구조가 난 세포막과 융합하며(Fig. 6), 그 내용물질이 1차 수정막 속으로 분비되는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 7). 이때 1차 수정막은 더욱 확장되고 주로 물질의 농도와 미세구조에 따라 5개 층으로 구분할 수 있는데(Figs. 7, 9), 이와 연관된 수정막을 본 연구에서는 최종 3차 수정막 형성과 관련하여 "2차 수정막"이라고 하였다. 2차 수정막 형성의 최종 단계에는 5개 층을 형성하며(Fig. 9), 이 층을 본 연구에서는 서술의 편의상 난자의 외부로부터 내부를 향하여 각각 1~5층으로 기술하고자 한다.

2차 수정막의 제 1, 2층은 난외막 표층을 형성하던 물질에 밀도 구배가 생기므로서 생성되는 것으로 보인다. 제 1층은 보다 밀도가 강한 최외곽 층이고 제 2층은 밀도는 보다 약하나 비교적 넓은 층이다(Figs. 7, 8, 9). 제 3층에는 크기와 형태가 일정하지 않고 유래가 분명하지 않은 막성 구조들이 집적된 층으로 최종 수정막 형성 단계에서 vesicle화 되는 것으로 보인다(Fig. 8). 제 4층을 구성하는 물질은 난자로부터

분비된 피질과립 물질인 것으로 보이며 (Figs. 6, 7, 8), 제5층은 난막 근접부로서 수정막이 최고의 분화상을 보일 때까지 약간의 미세용모를 포함하고 있는 층이다 (Fig. 8). 5개 층 중에서 제4층이 가장 넓고 형태상의 주요 구조로 관찰되었다 (Fig. 9).

#### (4) 3차 수정막

2차 수정막의 5개 층은 서로 융합하여 인공수정 후 60분 경에 2개 층으로 구분되는 3차 수정막, 즉 최종 수정막을 형성하는 것으로 관찰된다 (Fig. 10). 이중 최외곽 층은 2차 수정막의 제1층에서 유래된 것으로 보이고 내층은 2~5층이 융합하여 형성되는 것으로 보인다 (Fig. 9). 제2~5층이 융합은 제3층 막성구조의 vesicle화와 피질과립 물질의 분비와 확산으로 인하여 형성되는 것으로 관찰된다 (Fig. 8). 3차 수정막 (14~16  $\mu\text{m}$ )의 표층 (activation calyx; 0.7~1.0  $\mu\text{m}$ )은 미세 입자상이고 내층 (chorion)은 수 많은 입자형 물질들로 채워져 있다 (Fig. 10).

## 고 찰

본 연구에서는 개불 (*U. unicinctus*)의 침체반응과 수정막 형성 단계를 관찰하고 수정 전 후의 미세구조 변화를 비교한 결과, 난자 미세용모에 정자 수용체가 존재하는 것으로 생각되었으므로 이에 관하여 고찰하고자 한다.

동물 수정에서 침체반응은 종 특이성이 있으며, 이는 난막과 정자 막의 특성과 이에 따른 세포막 융합 조건을 의미 (Sato & Osanai, 1986)하고 정자 침체돌기의 구조와 관련되는 것으로 알려지고 있다. 개불 정자 침체돌기의 미세구조는 다른 해변동물인 불가사리 (Dan & Hagiwara, 1967), 성게 (Dan et al., 1964), 이매패류 (Niijima & Dan, 1965) 등에서 알려진 관상 (tubular) 침체돌기와 유사하였으나, 침체간격은 침체 기저부로부터 시작하여 서로 연속 구조를 이루고, 침체돌기의 형성은 이 기저부로부터 시작되는 것으로 관찰되므로서, 위 해변동물의 경우와는 다소 상이한 경우로 생각된다. 이들 해변동물에서는 침체돌기가 신장함에 따라 침체 간격이 증가하며 침체 물질은 형성되는 침체 미세소관의 sheath를 형성하는데 관여 (Inoue & Tinley, 1982)하고 있으나, 개불에서는 침체

돌기 형성에 침체 기저부로부터 물질이 공급되므로서 침체간격에는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 불가사리, 성게의 경우, 침체간격의 증가는 침체돌기의 axial core로 작용하는 전구물질과 액틴 침체돌기가 신장되는 것과 밀접한 관계가 있으며, 이러한 침체 형성기작은 trigger mechanism으로 보고된 바 있다 (Dan et al., 1964; Dan & Hagiwara, 1967). 미세구조 관찰에서 개불 침체돌기의 물질구성은 위 동물들과 유사한 것으로 보이나, 침체돌기는 침체의 기저부와 연속된 구조이고 침체돌기 형성중에 침체간격의 변화상이 위 동물과는 서로 상이할 뿐 아니라, 난 표층에 분비되는 과립상 침체물질이 관찰되는 것으로 보아서, 침체반응의 구체적인 내용은 불가사리 (Dan & Hagiwara 1967), 성게 (Dan et al., 1964) 등과는 달리 특징적인 것으로 보인다. 이는 개불의 침체가 위의 성게, 불가사리 등과는 달리 환상 (ring)구조인 것 (Fawcett et al., 1971; Fawcett, 1975)과도 관련된 것으로 생각되었다.

침체반응시 1차 수정막 형성에 참여하는 난자의 구조와 물질은 난외막의 표층 (surface coat)과 위란강 (perivitelline space) 및 이를 구성하던 물질이었으며, 이때 난세포질과 세포소기관에서 미세구조의 변화는 관찰하기 어려웠다. 수정으로 인한 난세포질의 반응은 5개 층으로 구분되는 2차 수정막이 형성될 때이었으며, 난자 피질부의 피질과립이 미세입자상 물질로 분비된 후 서로 혼합하는 과정을 통하여, 2개 층으로 구분되는 최종 3차 수정막이 형성되는 것으로 관찰되었다. 피질과립 물질이 위란강에 분비되어서 수정막을 형성하는 것은 개불의 다른 종류인 *U. caupo* (Gold-Somero & Holland, 1975)나 극피동물인 성게 (Anderson, 1968)의 피질과립 반응과 유사하였으나 개불에서는 피질과립 물질이 2차 수정막을 형성하는 주요 물질로 관찰되었다. 최종 수정막이 2개 층으로 구분되는 예는 성게에서 관찰된 바 있고, 그 외층과 내층을 각각 activation calyx와 chorion으로 명명되었으므로 (Anderson, 1968), 개불의 피질과립 반응이 성게와 매우 유사한 것으로 보아서 그 물질적 구성도 유사할 것으로 추측하였다. 그러나 개불의 경우 1, 2차 수정막 등 수정막 형성의 중간단계는 본 연구의 실험적 조건 (염분도 25‰, 온도 16°C)에서 관찰된 것이므로 성게 혹은 *U. caupo*에서도 유사한 실험 조

전에서는 수정막 형성의 중간 단계가 있을 것으로 생각할 수 있었다. 이러한 사실은 개불이 환형동물 혹은 극피동물에 속하는가의 논란에서, 수정의 사건에서 보면 극피동물과 유사하다는 것을 알 수 있는 것이었으며, 이는 개불의 난할이 나선형 난할(spiral cleavage pattern)로서 난할유형으로 본 분류적 위치가 환형동물보다는 극피동물과 유사성이 있다는 보고(Shin, 1997, 1998)와 연관된 것으로 생각되었다.

이와 같이 개불의 수정막은 미세구조에 의해서 1~3차 수정막으로 구분되었으나 피질과립 물질의 참여 여부에 따라, 참여하지 않는 1차 수정막과 참여하는 2, 3차 수정막으로 구분할 수 있었다. 이들 수정막 형성과정의 각 단계에 따른 미세구조, 미세용모의 수축과 구조변화, 수정막의 물질적 근원, 그리고, 정자 침체되기 전단부의 막성구조 및 침체에서 유래하는 난자 표층의 과립상 물질을 관찰하면 개불 난자에는 정자 수용체가 있고 이는 미세용모에 존재하는 것으로 보인다. 이 연구에서 정자 수용체와 정자가 접촉한 것이 관찰되지는 않았지만, 미세구조 관찰에 의한 난자의 수정 최초의 반응은 미세용모의 수축과 구조변화이었고, 동물계에서는 수정 후 이러한 반응으로 정자 수용체가 불활성화되는 다수의 예가 보고된 바 있다. 따라서 1차 수정막 형성시 침체되기 전단부에서 관찰된 막성 구조는 수정 직후 수축하는 미세용모와 깊은 관계가 있는 구조인 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 수정막 속의 1, 2차 극체와 난세포질에서 정자 핵의 구조변화(Longo & Anderson, 1968; 1970)로서 수정의 사실을 확인한 바 있고, 난 표층 위로 돌출하였던 미세용모들의 구조 변화와, 이와 동시적 사건인 1차 수정막의 두께 증가로 인하여 미세용모들이 1차 수정막 속으로 수축하는 일련의 반응이 정자 수용체의 불활성화와 연관(Sato & Osanai, 1986)되는 것으로 생각할 수 있었다. 또한 개불 미수정란 난외막의 두께는 2~3  $\mu\text{m}$ 이고 수정이 보다 두꺼운 난외막을 갖고 1차, 2차 결합으로 이루어지는 동물의 경우와는 다소 다른 것으로 보인다. 개불에서와 같이 피질과립 물질이 분비되기 전에 1차 수정막의 두께가 증가하는 것은 그 물질구성이 어떤 자극에 의해 체적을 증가시킬 수 있는 친수성 물질인 것에 원인이 있는 것으로 보고된 바 있다(Anderson,

1968). 미세용모의 수축과 구조변화는 정자 수용체의 불활성화로서 다수 정자의 침입을 차단하고 또한 난세포의 활성으로 인한 세포 표면적 증가(Eddy & Shapiro, 1976; Scheroder, 1979)와도 관계된 것으로 보인다.

동물 정자의 활성 유지 시간은 수정막 형성시간과 밀접하게 관련되는 것으로 보고된 바(Paul & Gold-Somero, 1976)있으므로 위와 같은 사항은 개불의 수정막 형성과정과 공급된 정자의 활성 감소의 관계에서도 볼 수 있었다. 1차 수정막은 수정 2~3분 경에 형성되었으며 공급된 정자는 수정 10분 경에 활성이 크게 감소하였고 30분 경에는 소멸되는 것으로 관찰되었으나, 그 구조와 물질 구성에서 다수 정자의 침입을 차단할 수 있는 3차 수정막이 형성되는 것은 수정 60분 경이었다. 광학현미경으로 개불의 3차 수정막을 볼 때는 특이한 구조가 관찰되지 않으나, 그 미세구조에서는 수많은 미세 입자의 응집체로 관찰된다. 이와 같은 구조는 성계에서 chorion으로 명명되고, 피질과립과 함께 ovoperoxidase의 분비로서 수정막 물질들이 교차(cross-link)되고 섬유화된 물질로 보고된 바 있다(Foeder & Sapiro, 1977).

Chorion은 다수 정자를 차단하는 효과적인 장벽이며 할구의 기저막으로 작용하며, 또 물리적 충격과 mercaptan 등의 용매에 저항성(Grey et al., 1974)을 갖는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 개불에서 chorion이 생성되는 시기(수정 60분 경)는 개불 정자의 활성 유지 시간과 일치하지 않았다. 이와 같이 개불 정자의 활성유지 시간, 1차 수정막 형성 및 이와 동시적 사건인 미세용모의 수축 등으로 보면 다수 정자의 침입을 차단하는 주요 기능은 1차 수정막에도 있는 것으로 생각되었다. 그러나 1차 수정막과 위란강의 유사한 물질구성으로 보면, 위 1차 수정막의 기능은, 이를 구성하는 물질적 요인보다는 미세용모 등 정자 수용체가 1차 수정막내로 수축하는 현상에 원인이 있는 것으로 보인다. 이와 같은 이유에서 수정시 개불 정자의 침체되기 전단부에서 관찰되는 구형 막성 구조의 기원은 난세포의 미세용모이고, 따라서 정자 수용체는 미세용모에 있는 것으로 추측되었다.

일반적으로 동물의 난자는 감수분열의 여러 단계에서 수정이 가능한 것으로 알려지고 있으나, 이는

중 특이성에 따른 난자의 성숙도에 의존한다(Longo & Anderson, 1968). 개불에서는 정자 침투 후 난자의 수정막 속에서 제 1극체 및 제 2극체 등 3개의 극체들이 관찰됨으로써 해면동물, 다모류(Austin, 1965) 등과 같이 감수분열 전에 수정이 가능한 것으로 보인다. 이는 1, 2차 감수분열이 완료된 후 수정이 가능한 성계의 난세포(Longo & Anderson, 1968)와는 다른 것으로서, 피질과립 반응, 난할 유형 등은 극피동물인 성계와 유사하였으나, 난자의 수정 유형은 서로 상이한 것으로 보인다.

### 참 고 문 헌

- Anderson E: Oocyte differentiation in the sea urchin, *Arbacia punctulata*, with particular to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. J Cell Biol 37 : 514-538, 1968.
- Austin CR: Fertilization. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1965.
- Begg DA, Rebhun LI, Hyatt H: Structural organization of actin in the Sea urchin egg cortex: Microvillar elongation in the absence of the actin filament bundle formation. J Cell Biol 93 : 24-32, 1982.
- Dan J, Hagiwara Y: Studies on the acrosome IX. Course of acrosome reaction in the starfish. J Ultra Struct 18 : 562-579, 1967.
- Dan J, Ohori Y, Kushida H: Studies on the acrosome VII. Formation of the acrosome process in sea urchin spermatozoa. J Ultra Res 11 : 508-524, 1964.
- Eddy EM, Shapiro BM: Changes in the topography of the sea urchin egg after fertilization. J Cell Biol 71 : 35-48, 1976.
- Elison RP, Manes ME: Morphology of the site of sperm entry on the frog egg. Dev Biol 63 : 67-75, 1978.
- Epel D, Vaquier VD: Membrane fusion events during invertebrate fertilization. In: G. Poste and G.L. Nicolson, ed, Membrane Fusion, pp. 1-63, North Holland, Amsterdam, 1978.
- Fawcett DW, Anderson WA, Philips DW: Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. Dev Biol 26 : 220-251, 1971.
- Fawcett DW: The mammalian spermatozoon. Dev Biol 44 : 394-436, 1975.
- Foeder CA, Sapiro BM: Release of ovoperxidase from sea urchin egg hardens the fertilization membrane with tyrosine crossing-linking. Proc Natl Acad Sci (USA) 74 : 4214-4218, 1977.
- Giusti AF, Hoang KM, Foltz KR: Surface localization of the Sea urchin egg receptor for sperm. Dev Biol 184 : 10-24, 1997.
- Gold-Somero M, Holland L: Fine structural investigation of the insemination response in *Urechis caupo*. Dev Biol 46 : 358-369, 1975.
- Gold-Somero M, Stephano JL: Peptides from sperm acrosomal protein that initiate egg development. Dev Biol 146 : 509-518, 1991.
- Gray RD, Wolf DP, Hedrick JL: Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*. Dev Biol 36 : 44-61, 1974.
- Inoue S, Tilney LG: Acrosome reaction of Thyone sperm. I. Changes in the sperm head visualized by high resolution video microscopy. J Cell Biol 93 : 812-819, 1982.
- Iwamatsu T, Ohta T: Electron microscopic observation on the sperm penetration and pronuclear formation in the fish egg. J Exp Zool 205 : 157-180, 1978.
- Linhardt O, Kudo S: Surface ultrastructure of paddlefish eggs and before and after fertilization. J Fish Biol 51 : 573-582, 1997.
- Longo FJ, Anderson E: An ultrastructural analysis of fertilization in the surfclam *Spisula solidissima*. II. Development of the male pronucleus and the association of the maternally and paternally derived chromosome. J Ultrastruct Res 33 : 515-527, 1970.
- Longo FJ, Anderson E: The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. J Cell Biol 39 : 339-368, 1968.
- Monary A, Rosati F: A comparative analysis of sperm-egg interaction. Gamete Res 5 : 49-60, 1983.
- Nijijima L, Dan J: The acrosome reaction in *Mytilus edulis*. J Cell Biol 25 : 243-248, 1965.
- Paul M, Gold-Somero M: Evidence for a polyspermy block at the level of sperm-egg plasma membrane fusion in *Urechis caupo*. J Exp Zool 196 : 105-112, 1976.
- Sato M, Osanai K: Morphological identification of sperm receptors above egg microvilli in the Polychaete, *Neanthes japonica*. Dev Biol 11 : 263-270, 1986.
- Sato M, Osanai K: Sperm reception by an egg microvillus in the Polychaete, *Tylorrhynchus heterochatetus*. J Exp Zool

- 227: 459-469, 1983.
- Scheroder TE: Surface area change at fertilization : Resorption of the mosaic membrane. Dev Biol 70: 306-326, 1979.
- SeGall GK, Lennarz WJ: Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. Dev Biol 71: 33-48, 1979.
- Shin KS, Lee SH: The structure and its functional aspects of the cilia on epithelial cells in the foregut in the *Urechis unicinctus*. Soochuunhyang J Natl Sci 3(1): 229-242, 1997.
- 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(2): 193-205, 1998.
- Tyler A: The biology of chemistry of fertilization. Am Nat 99: 309-334, 1965.
- Vacquier VD: Dynamic changes of the egg cortex, Dev Biol 84: 1-26, 1981.
- Wyrick RE, Nishihara T, Hedrick JL: Agglutination of jelly coat and cortical granule components and block to polyspermy in the amphibian *Xenopus laevis*. Proc Natl Acad

Sci (U.S.A) 71: 2067-2071, 1974.

#### < 국문 초록 >

*U. unicinctus* 난자를 대상으로 인공수정 후 수정막 형성에 따른 물질적 기원과 침체반응 등에 관련된 구조변화에 대하여 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 관찰결과에 의하면 1차 수정막의 물질은 과잉의 정자에 대한 효과적 방어 기능을 보유한 난외막 표층 기원의 물질이었으며, 2차 수정막은 피질과립의 분비에 의하여 형성되었다. 3차 수정막은 광학현미경하에서 특이한 구조의 관찰은 없었으나 전자현미경에 의한 관찰시 많은 입자상 물질들로 구성되었으며, 수정 후 60분에는 이들 입자물질의 응집에 의해서 수정막은 경화되는 것으로 관찰되었다. 1차 수정막과 난외막 표층의 유사성 그리고 1차 수정막의 형성과 미세용모의 퇴화가 동시적인 사건이라는 것은 미세용모가 *U. unicinctus*에서 정자의 수용체로 작용할 수 있는 것으로 추정할 수 있었다. 침체소관에 의한 난세포막 침투시 침체 단부에서 과립상의 물질이 표층(surface coat)에 확산되었다. 침체소관은 침체의 기부에서 시작되고, 침체간격을 통하여 신장되었다.



## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** A light microscope of the 2nd fertilization envelope (F) by 10 min. after artificial insemination.  $\times 1,600$ .
- Fig. 2.** The 3rd fertilization envelope (F) with its full thickness ( $14 \sim 16 \mu\text{m}$ ). The envelope seems like to be amorphous under light microscope, but numerous aggregates of particles can be seen under EM (Fig. 10). Polar body (P)  $\times 1,600$ .
- Fig. 3.** The surface coat (S) and perivitelline space (PS) of a unfertilized oocyte. The protuberances of intact microvilli (M) and some cortical granules (C) beneath the oocyte plasma membrane can be seen. Yolk granule (Y). Bar :  $0.9 \mu\text{m}$ .
- Fig. 4.** The microvilli (M) retracted into the perivitelline space (Ps) when the acrosomal tubule (A) contact on the surface coat of the egg, but the cortical granules of the oocyte are yet intact. Bar :  $2 \mu\text{m}$ .
- Fig. 5.** The acrosomal tubules penetrate into the surface coat while some granular acrosomal substances diffuse onto the surface coat. The membranous structures (arrow) in front of the acrosomal tubules are suggested to be closely associated with the retraction of microvilli. Nucleous (N); Acrosomal tubule (A). Bar :  $0.8 \mu\text{m}$ .
- Fig. 6.** The membrane of cortical granules (C) are fused with egg plasma membrane and secrete its contents into the perivitelline space (PS). The secretion contribute to form the 2nd fertilization envelope. Cross sectioned sperm tail (arrow); Surface coat (S). Bar :  $0.8 \mu\text{m}$ .
- Fig. 7.** The 2nd fertilization envelope can be counted into 5 layers, from outside of the envelope, inwardly 1 ~ 5. The substantial origin of the 4th layer is the cortical granules, as seen in Figs. 6 and 7. Bar :  $1 \mu\text{m}$ .
- Fig. 8.** An intermediate stage from the 2nd to the 3rd fertilization envelope. It appears that the substances are fused or mixed (arrow) together to form the final envelope. Surface coat (S); Cortical granule cluster (Cc); Vesiculation (V). Bar :  $2 \mu\text{m}$ .
- Fig. 9.** The substances of the 2nd fertilization envelope are more homogeneous rather than the previous stage (Fig. 8) and the layers could not be easily distinguished. Bar :  $1 \mu\text{m}$ .
- Fig. 10.** The 3rd fertilization envelope is composed of 2 layers. The outer layer come from the surface coat (S) and the inner layer (Fl) arised mainly from the secretions of the cortical granules. Sperm decondensation (Sp). Bar :  $5 \mu\text{m}$ .





