

## 황소개구리 (*Rana catesbeiana*)의 정자변태과정 중 글리코겐이 정자 성숙에 미치는 역할

고 송 향, 이 정 훈\*  
경남대학교 자연과학대학 생명과학부

### Glycogen Effect of the Sperm Maturation during the Spermiogenesis of *Rana catesbeiana*

Song-Haang Go and Jung-Hun Lee\*  
Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kyungnam University,  
Kyungnam, 631-701 Korea  
(Received August 8, 2001)

#### ABSTRACT

To investigate the process of spermoigenesis and glycogen effect during the spermatogenesis of *Rana catesbeiana*, the morphological characteristics of the testes were examined by light and transmission electron microscopy. Spermiogenesis of *R. catesbeiana* was divided into three stages on the basis of the features of the nucleus and the cytoplasm organelles. Except for the primary spermatogonia, the phases from the spermatocytogenesis to the spermatids before spermiation phase were surrounded by spermatocyst. Especially, the glycogen particles were not observed until in the stage of spermatocytogenesis, but from the early spermatids to the maturation phase were observed in the nucleus, acrosome and cytoplasm of the spermatids. The present result suggests that the glycogen may play an important role in the sperm maturation, and as a source of the energy in the wave-movement of sperm tail.

**Key words** : Glycogen, Spermatocyst, Spermiogenesis

#### 서 론

양서류의 정자는 다른 척추동물과는 달리 편모에 나선막 (helical membrane) 혹은 파동막 (undulating membrane)이라 불리는 얇은 세포질막과 axial rod를

갖는 것이 특징적이다 (Baker & Baker, 1973; Baccetti & Afzelius, 1976; Swan et al., 1980). 특히, 무미류 정자들의 형태적 다양성은 두부 (Furieri, 1975; Bernardini et al., 1986; Asa & Phillips, 1988)와 침체의 모양 (Sandoz, 1970; Sprando & Russell, 1987; Rastogi et al., 1988), perforatorium의 유무 (Burgos & Fawcett,

본 논문의 요지는 제31차 한국전자현미경학회 추계학술대회(2000년)에서 발표되었음.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Jung-Hun Lee, Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kyungnam University, Masan, Kyungnam, 630-701 Korea. Ph.: 055-249-2243, FAX: 055-249-2238, E-mail: jhlee@kyungnam.ac.kr  
Copyright © 2001 Korean Society of Electron Microscopy

1956; Sandoz, 1974; Furieri, 1975; Bernardini et al., 1986; Sprando & Russell, 1988; Lee & Kwon, 1992; Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995), ring 구조물의 유무(Baker & Baker, 1969; Sandoz, 1974), 파동막 그리고 axial rod의 유무(Burgos & Fawcett, 1956; Sandoz, 1974; Furieri, 1975; Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995) 등으로서, 이러한 특징들은 제각기 중 특유의 형태적 다양성을 나타낸다.

정자와 글리코젠과의 관련성에 관한 연구로는 무척추동물(Erwin & Halton, 1983; Cifrian et al., 1993; Stoitsova et al., 1995; Miquel et al., 1999)과 척추동물(Stanley, 1971; Panse & Sheth, 1981; Asa & Phillips, 1987; Kim et al., 1990; Ballester et al., 2000)에 대해 다수가 보고되었다.

양서강 무미류 정자에 관한 연구는 주로 정자형성과 정자변태 과정 중의 생식세포의 미세구조에 대해 다수 보고된 바 있으나(Burgos & Fawcett, 1956; Sandoz, 1974; Furieri, 1975; Bernardini et al., 1986; Sprando & Russell, 1988; Lee & Kwon, 1992; Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995; Go & Lee, 2001) 정자변태 과정에서 정자성숙과 관련한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 황소개구리의 정자변태과정 중 글리코젠의 출현 시기와 장소 및 정자성숙에 미치는 역할을 알아보기 위하여 시도되었다.

## 재료 및 방법

본 연구는 경남 창녕 우포늪에서 1999년 10월경에 채집한 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 수컷 4개체를 사용하였으며, 채집 즉시 실험실로 운반하여 ethyl ether로 마취 후 정소를 적출한 다음 10%-중성 formalin으로 고정하여 통상적인 표본제작 방법으로 시행한 후 6  $\mu$ m 두께로 박절한 다음 periodic acid Schiff 반응을 실시하여 광학현미경(Nikon, UFX-DX)으로 관찰하였다. 또한 정자변태과정 중 정자세포의 형태적 특징을 알아보기 위하여 정소들을 세절하여 3%-glutaraldehyde (4°C, pH 7.4, Millonig's buffer)와 1.33%-OsO<sub>4</sub> (4°C, pH 7.4, Millonig's buffer)로 각각 3시간 전고정 및 후고정을 하였다. 고

정이 끝난 조직들은 동일한 완충액(4°C, pH 7.4, Millonig's buffer)으로 수세한 다음 acetone 상승 농도 순으로 탈수하여 Epon 812 혼합액으로 포매하여 굳혔다. 포매된 조직은 ultramicrotome (Sorvall, MT-6000)을 이용하여 1  $\mu$ m 두께로 세절한 다음 0.5%-toluidine blue로 염색하여 세포분화의 각 단계를 광학현미경으로 확인한 다음, 60~90nm의 두께로 연속적인 절편을 얻어 uranyl acetate와 lead citrate 용액으로 이중 염색하여 전자현미경(TEM, H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 광학현미경적 소견

정낭(spermatocyst)내 정모세포발생 단계의 생식세포들은 periodic acid Schiff 반응에 음성으로 나타난 반면에, 초기 정자세포와 성숙 중의 정자세포의 세포질에서는 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 1a, b).

### 2. 전자현미경적 소견

정자변태는 침체의 형태, 핵과 세포질 소기관의 형태적 특징을 기초로 하여 3단계로 구분되어졌고, 글리코젠의 출현시기와 존재부위를 조사한 결과는 다음과 같았다(Table 1, Figs. 2-10).

#### 1) I단계

정자변태 초기 단계에서 정자세포의 핵은 구형 또는 타원형을 취하고 있었으며, 크고 작은 공포(vacuole)들이 인접한 침체부분을 비롯하여 세포질 전역에 존재하고 있었다(Figs. 2, 3). 특히 이 시기부터 정자세포의 핵(Fig. 2, Inset)과 침체(Fig. 3)내에는 다량의 글리코젠 과립들이 내재되어 있었고, 뿐만 아니라 세르틀리 세포의 세포질 내에서도 글리코젠 과립들이 풍부하게 산재해 있었다(Figs. 2, 3 (arrowheads), 4 (arrowheads)).

#### 2) II단계

핵질은 더욱 농축되었고 핵은 I단계보다 더욱 신장하여 양끝이 가는 원통형을 취하고 있었다(Figs. 7).

**Table 1.** Comparison of localization of the glycogen during the spermiogenesis in vertebrates

Region	Species	Fish		Ranidae		Avian		Mammalian		
		Ss	Rc	Rd	Rn	Eee	B	D	H	R
Sperm Head	A		*							
	N		*	(3)	(3)		(4)	(4)	(4)	(4)
Sperm Tail	Mp	(1)	*			(2)	(4)	(4)	(4)	(4)
	Pp					(2)				
	Ep									

A, acrosome; B, boar; D, dog; Eee, *Eudromia elegans elegans*; Ep, end piece; H, horse; Mp, middle piece; N, nucleus; Pp, principal piece; Rc, *Rana catesbeiana*; Rd, *Rana dybowskii*; Rn, *Rana nigromaculata*; Ss, *Squalus suckleyi*; —, glycogen; (1), Stanley (1971); (2), Asa & Phillips (1987); (3), Kwon & Lee (1995); (4), Ballester et al (2000); \*, This study.

정자세포의 세포질에는 다량의 글리코젠 과립들이 커다란 덩어리로 뭉쳐져 있었다(Figs. 5, 6). 특히 이 시기의 정자세포들은 정낭 밖으로 이탈하였고(Fig. 7), 정자두부는 세르틀리세포의 세포질 내에 박혀져 있었다(Fig. 8). 여전히 핵내에는 다량의 글리코젠들이 존재하고 있었다(Fig. 8).

3) III단계

이탈한 정자세포는 내강에 위치하고 있으며, 세포질내에는 하나의 커다란 글리코젠 축적물을 보여주고 있다(Fig. 9). 성숙이 완료된 정자꼬리의 중편부(middle piece)에서도 글리코젠 입자들이 들어 존재하고 있었다(Fig. 10).

고 찰

글리코젠의 존재 양상을 보면, 무척추동물의 경우 Digenea의 *Dicrocoelium dendriticum*는 정자를 4부분(anterior tip, mitochondrial region, nuclear region, posterior tip)으로 나눌 때 미토콘드리아와 핵 부분에 분포하며(Cifrian et al., 1993), Tetrabothriidae의 *Tetrabothrius erostris*는 정자를 3부분(proximal part, middle region, distal part)으로 나눌 때 middle region에서(Stoitsova et al., 1995), Mesocestoididae의 *Mesocestoides litteratus*의 정자를 I~IV부분으로 나눌 때, II부분에서 글리코젠이 존재하는 것으로 보고되었다(Miquel et al., 1999). 또한 *Dicrocoelium dendriticum*의

경우 정소내의 정자에만 다량의 글리코젠이 존재하고(Cifrian et al., 1993), *Bucephaloides gracilescens*의 경우에는 정자가 정소를 떠난 후에만 글리코젠이 나타나는 것으로 보아, 글리코젠이 풍부한 세정관과 사출관의 벽으로부터 정자쪽으로 공급되어진다고 보고하였다(Erwin & Haltion, 1983). 척추동물에서 Fish의 *Squalus suckleyi*는 중편부에 위치하며(Stanley, 1971), Ranidae의 *Rana dybowskii*와 *Rana nigromaculata*는 핵 내에, Avian의 *Eudromia elegans elegans*는 중편부와 주편부(Asa & Phillips, 1987), 그리고 Mammalian의 Boar, Dog, Horse와 Ram은 두부와 중편부에 존재한다(Ballester et al., 2000). 특히 Man, Monkey 그리고 Ram의 경우 PAS 반응의 결과에 의하면, 침체과립이 선택적으로 염색되고, 침체는 1, 2-glycol grouping을 가진 다당류를 포함하고 있는데 이것은 글리코젠이나 녹말도 아니며, 더욱이 hyaluronic acid도 아니라고 보고하였다(Clermont & Leblond, 1955). Fish와 Frog(Cavazos & Melampy, 1954) 그리고 Toad(Burgos & Fawcett, 1956)의 침체에서는 PAS 반응이 일어나지 않았다고 보고되었다. 본 연구에 의하면, 정자세포의 침체 뿐만 아니라 핵 그리고 세포질을 비롯하여 중편부에서도 글리코젠들이 존재하고 있었으며, 정자변태과정 중의 초기단계에서는 다량의 글리코젠들이 세르틀리 세포의 세포질에도 잔재하고 있었다. 이것으로 보아 정자변태과정 중에 세르틀리 세포의 세포질내 글리코젠들이 정자변태과정에서 직접 정자형태 변화에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

한편, *Bucephaloides gracilescens* (Erwin & Halton, 1983), *Dicrocoelium dendriticum* (Cifrian et al., 1993), *Tetrahymena erostri* (Stoitsova et al., 1995), *Mesocestoides litteratus* (Miquel et al., 1999), *Squalus suckleyi* (Stanley, 1971), *Eudromia elegans elegans* (Asa & Phillips, 1987), Boar, Dog, Horse와 Ram (Ballester et al., 2000)의 경우에는 정자세포부터 글리코겐이 존재하는 것으로 보고되었다. 그러나 본 연구에서는 정모세포 발생단계에서는 글리코겐이 존재하지 않은 반면에, 정자변태 초기의 정자세포부터 성숙기까지 정자에서는 다량의 글리코겐이 존재하고 있었다 (Table 1, Figs. 1-10).

Bonnet monkey의 경우 정모세포발생 단계에서는 해당작용이 활발히 일어나지만 정자변태과정을 거친 정자가 정소에서 사출관으로 이행하는 동안 해당과정은 감소하고 해당과정과 정반대 과정이 점차적으로 증가하였는데, 이것은 정자의 기능적 성숙과 해당과정이 서로 밀접한 관련이 있을 것으로 보고하였다 (Panse et al., 1983). 이러한 현상은 생쥐 정자 (Panse & Sheth, 1981)의 경우에도 유사한 결과를 나타내었다. Bovine 정자의 phosphatase 활성도는 운동성이 있는 미부내 정자가 운동성이 없는 두부내의 정자에 비하여 두배 정도 감소하였고 (Vijayaraghavan et al., 1996), 생쥐의 경우에도 미부내 정자의 phosphatase 활성도가 두부내 정자에 비하여 현저히 감소하였는데, 이러한 phosphatase의 활성이 감소되는 것은 성숙과정에서 정자가 수정능력을 획득하는데 중요한 역할을 수행함을 시사한다 (Kim et al., 1990). 본 연구의 결과에 의하면, 초기 정자변태과정 중의 세르톨리 세포의 세포질내에는 다량의 글리코겐들이 산재해 있다가 정자세포의 성숙이 완료되기까지 점차적으로 세르톨리 세포의 세포질내 글리코겐들이 줄어들었고 오히려 초기 정자세포보다는 성숙과정 중의 정자세포에 더 많은 글리코겐이 다량으로 산재해 있었다. 이는 정자가 성숙하면서 수정능 획득을 위한 글리코겐 분해 (glycogenolysis) 작용이라 여겨진다. Cifrian 등은 (1993) *Dicrocoelium dendriticum*의 정자내 글리코겐은 정자운동의 기질 (substrate)로 사용된다고 하였고, Ballester 등 (2000)은 성숙한 포유류 정자의 글리코겐 대사작용은 정자가 에너지를 가진 상태로 있어

에너지를 유지하고 정자세포의 생존력에 도움을 주어 포유류 번식에 성공 가능성을 높인다고 하였다. 그럼에도 불구하고 여전히 정자내 글리코겐의 생리적 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서 정자변태과정 중 초기 정자세포에서 나타나기 시작하는 글리코겐이 세르톨리 세포의 세포질에서 정자세포 쪽으로 유입되어 짐을 볼 때 (Figs. 3, 4), 이는 정자성숙에 필요한 에너지원으로 이용됨을 시사한다. *Squalus suckleyi* (Stanley, 1971), *Eudromia elegans elegans* (Asa & Phillips, 1987), Boar, Dog, Horse와 Ram (Ballester et al., 2000)의 경우와 특히 본 연구에서 성숙 완료된 정자의 중편부에서 다량의 글리코겐이 존재하는 것으로 보아 글리코겐이 정자의 파동운동에 있어 중요한 에너지원으로서 이용될 가능성을 시사한다.

## 참 고 문 헌

- Asa CS, Phillips DM: Ultrastructure of avian spermatozoa: A short review. In: H. Mohri, *New Horizons in Sperm Cell Research*. Tokyo Japan Sci Soci Press pp. 365-373, 1987.
- Asa CS, Phillips DM: Nuclear shaping in spermatids of the Thai Leaf frog *Megophrys montana*. *Anat Rec* 220: 287-290, 1988.
- Baccetti B, Afzelius BA: The biology of the sperm cell. *Monogr Dev Biol* 10: 1-254, 1976.
- Baker KR, Baker CL: Urodele spermateliosis: A comparative electron microscope study. In B. Baccetti (ed.), *Comparative spermatology*. pp. 81-87 Academic Press, New York, 1973.
- Ballester J et al.: Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Develop* 56: 207-219, 2000.
- Bernardini G, Stipani R, Melone G: The ultrastructure of *Xenopus* spermatozoon. *J Ultrastr Mol Res* 94: 188-194, 1986.
- Burgos MH, Fawcett DW: An electron microscope study of spermatid differentiation in the Toad, *Bufo arenarum* Hensel. *J Biophysic Biochem Cytol* 2: 223-253, 1956.
- Cavazos L, Melampy RM: A comparative study of periodic-acide-reactive carbohydrates in vertebrate testes. *Amer J Anat* 95: 467-495, 1954.

- Cifrian B, Garcia-Corrales P, Martinez-Alos S: Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea). *Parasitol Res* 79 : 204-212, 1993.
- Clermont Y, Leblond CP: Spermatogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique. *Amer J Anat* 96 : 229-254, 1955.
- Erwin BE, Haltion DW: Fine structural observations on spermatogenesis in a progenetic trematode, *Bucephaloides gracilescens*. *Int J Parasitol* 13 : 413-426, 1983.
- Furieri P: The peculiar morphology of the spermatozoon of *Bombina variegata* (L.). *Monitore Zoo Ital* 9 : 185-201, 1975.
- Go SH, Lee JH: Differentiation of seminiferous epithelium and spermiogenesis in the testis of *Rana catesbeiana*. *Korean J Electr Microscopy* 31 : 143-156, 2001 (Korean).
- Kim MK, Yoon HS, Kim CH, Kim SR: Changes in phosphatase activities of mouse epididymal spermatozoa during maturation. *Korean J Zool* 33 : 70-77, 1990.
- Kwon AS, Kim HJ, Lee YH: Fine structure of the neck of spermatozoa and spermiogenesis in *Bufo bufo gargarizans* (Amphibia, Anura). *Nature Life* 23 : 95-105, 1993.
- Kwon AS, Lee YH: Comparative Spermatology of Anurans with special references to phylogeny. *Mém Mus Natn Hist Nat* 166 : 321-332, 1995.
- Lee YH, Kwon AS: Ultrastructure of spermiogenesis in *Hyla Japonica* (Anura, Amphibia). *Acta Zoologica* 73 : 49-55, 1992.
- Miquel J, Feliu C, Marchand B: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *Int J Parasitol* 29 : 499-510, 1999.
- Panse GT, Jayaraman S, Sheth AR: Shift of glycolysis as a marker of sperm maturation. *Archives Androl* 11 : 137-140, 1983.
- Panse GT, Sheth AR: Glycogen metabolism in epididymal spermatozoa of developing mice. *Ind J Exp Biol* 19 : 183-185, 1981.
- Rastogi RK, Bagnara JT, Iela L, Krasovich MA: Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: A light and ultrasonic study. *J Morphol* 197 : 277-302, 1988.
- Sandoz D: Étude cytochimique des polysaccharides au cours de la spermatogen se d'un amphibien anoure: le discoglossus *Discoglossus pictus* (Oth.). *J Microscopie* 9 : 243-262, 1970.
- Sandoz D: Modifications in the nuclear envelope during spermiogenesis of *Discoglossus pictus* (Anuran Amphibia). *J Submicr Cytol* 6 : 399-419, 1974.
- Sprando RL, Russell LD: A comparative study of Sertoli cell ectoplasmic specializations in selected nonmammalian vertebrates. *Tissue Cell* 19 : 479-493, 1987.
- Sprando RL, Russell LD: Spermiogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J Morph* 198 : 303-319, 1988.
- Stanley HP: Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch Fish *Squalus suckleyi* II. Late stages of differentiation and structure of the mature spermatozoon<sup>1,2</sup>. *J Ultrastr Res* 36 : 103-118, 1971.
- Stoitsova SR, Georgiev BB, Dacheva RB: Ultrastructure of the spermatogenesis and the mature spermatozoon of *Tetrabothrius erostris* Loennberg (Cestoda, Tetrabothriidae). *Int J Parasitol* 12 : 1427-1436, 1995.
- Swan MA, Linck RW, Ito S, Fawcett: Structure and function of the undulating membrane in spermatozoan propulsion in the toad *Bufo marinus*. *J Cell Biol* 85 : 866-880, 1980.
- Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, Edgar F. da Cruz e Silva, Greengard P: Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 54 : 709-718, 1996.

#### < 국문 초록 >

황소개구리의 정자변태과정과 정자형성단계 중에 글리코겐이 정자 성숙에 미치는 역할을 알아보기 위하여 관찰한 결과는 다음과 같았다. 정자변태과정은 핵과 세포질 소기관의 형태적 특징을 토대로 하여 3단계로 나눌 수 있었다. 특히, 정자형성단계 중에서 글리코겐은 정원세포부터 정모세포발생 단계까지는 관찰되지 않았지만, 정자변태단계인 초기 정자세포부터 성숙기까지는 정자세포의 핵과 침체 및 세포질 내에 존재하고 있었고, 성숙한 정자의 중편부에도 위치하고 있었다. 이러한 사실은 글리코겐이 정자 성숙에 중요한 역할을 수행할 뿐만 아니라 정자의 파동운동에 에너지원으로서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1(a-b).** Light micrographs showing the seminiferous tubule of the testis of *Rana catesbeiana*. (a), Note that elongated spermatid cytoplasm showed positive reaction (magenta). The germ cell in the spermatocytogenesis showed no reaction. (b), The early spermatid cytoplasm in the spermatocyst was positive reaction (magenta). They stained with periodic acid Schiff reactions. S, sperm; St, spermatid. All scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 2.** Electron micrograph of showing the early spermatids of spermiogenesis (Stage I). The nuclei shaped round or oval. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ . Note the glycogen particles existed in the nucleus of sperm (Inset) and the Sertoli cell cytoplasm. G, glycogen; M, mitochondria; N, nucleus. V, vacuole. Inset: Scale bar = 0.5  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 3.** High magnification of fig. 2. The glycogen particles (arrowheads) is folding from the Sertoli cell cytoplasm to the acrosome. A, acrosome; G, glycogen; N, nucleus; V, vacuole. Scale bar = 0.5  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 4.** Electron micrograph showing the glycogen particles (arrowheads) in the acrosome and the spermatid cytoplasm. N, nucleus; V, vacuole. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 5.** Electron micrograph of the glycogen particles (arrowheads) in the cytoplasm. The spermatids are more elongated than fig. 4. N, nucleus. Scale bar = 2  $\mu\text{m}$  (Stage II).
- Fig. 6.** Electron micrograph showing high magnification of Fig. 5. G, glycogen; N, nucleus. Scale bar = 0.5  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 7.** Electron micrograph showing the glycogen particles in the nucleus. G, glycogen; N, nucleus. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 8.** Parasagittal section of the spermatid. Note the glycogen particles in the nucleus and a large accumulation of glycogen in the cytoplasm. G, glycogen; N, nucleus. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .
- Fig. 9.** Electron micrograph showing a large accumulation of glycogen in the cytoplasmic lobe. G, glycogen; L, lumen; N, nucleus. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$  (Stage III).
- Fig. 10.** Electron micrograph showing the mature spermatozoon. Glycogen particles existed in the middle piece of the sperm. G, glycogen; M, mitochondria; N, nucleus. Scale bar = 0.5  $\mu\text{m}$ .









