

생쥐의 정자 추출물이 정자-난자의 결합에 미치는 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 제일병원 체외수정 연구실*

김문규 · 계명찬 · 최규완* · 윤현수 · 김종흡

Effects of Sperm Extracts on Sperm-Egg Binding in Mouse

Moon Kyoo Kim, Myung Chan Gye, Kyoo Wan Choi*, Hyun Soo Yoon and Jong Heup Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University.
IVF Research Laboratory, Cheil General Hospital*

= Abstract =

In order to study the sperm-egg interaction during fertilization process in mouse, the effects of sperm concentration, the duration of capacitation and insemination, the stages of maturation and development of eggs, and sperm extracts and BSA on sperm binding to egg were examined.

Sperm-egg binding was increased depending on sperm concentration within the range of 10^3 - 10^6 sperm/ml. It showed the most numbers of sperm-egg binding at 60min from the beginning of preincubation(capacitation) and insemination, respectively. During sperm capacitation, sperm-egg binding inhibitor was released from sperm into the incubation medium. Sperm extracts containing trypsin-like enzyme which is secreted through the acrosome reaction increased the binding. BSA in the culture medium showed a positive effect on the binding. It is suggested that physicochemical alterations of zona pellucida in the process of maturation and fertilization of eggs led to inhibition of sperm-egg binding.

서 론

포유류의 정자가 난자를 수정하기 위해서 여성 생식수관을 거치는 동안 원형질막 표면의 변화 및 운동성 등의 변화를 거쳐 침체반응이 일어날 수 있는 상태로 되는데 이를 수정능력부여(capacitation)라 하였다(Austin, 1951; Chang, 1951). 난자 주위에 도달한 정자는 난구세포를 헤치고 들어가 수정의 첫 단계로 난자의 투명대와 결합하게 된다. 이러한 정자의 수정능력부여 과정은 종특이성을 보이지 않는 반면(Saling & Bedford, 1981), 정자-난자 결합은 상대 배우자의 세포표면에 위치하는 상보적인 당부위(sugar moieties)의 결합에 의하며(Bleil & Wasserman, 1986) 종특이성을 나타내는 것으로 알려졌

다(Yanagimachi, 1972; O'Rand, 1988).

생쥐에서 배우자간의 결합은 난자의 투명대 단백질인 ZP3의 O-linked oligosaccharide chain과 수정능력이 부여된 정자표면의 수용체가 결합하는 것으로 알려졌다(Florman & Wasserman, 1985; Wasserman, 1988). 초기의 결합이 이뤄진 후 ZP3의 단백질 부분은 정자의 원형질막과 침체외막의 융합을 촉진하여 침체반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Florman et al., 1984; Cross et al., 1988). 침체반응을 일으킨 정자는 ZP3와 매우 견고한 결합을 형성하는데(Bleil et al., 1981; Wasserman, 1988) 정자의 단백질 분해효소(Poirier et al., 1986; Robinson et al., 1987), 침체효소(acrosomal enzyme)(Bhattacharyya et al., 1979; Yanagimachi & Phillips, 1984)등이 결합에 관여하는 것으로 알려졌다.

Saling (1981)은 수정능력이 부여된 정자를

본 연구는 1990년 문교부 기초과학육성 연구비 지원에 의한 것임.

trypsin inhibitor로 처리하여 난자와 결합을 유도하면 정자-난자 결합이 억제되나 정자와 난자 사이에 1차적 결합이 이뤄진 후에는 억제효과가 없었다고 보고하였으며 정자-난자 결합의 초기단계에 트립신과 유사한 단백질 분해효소(trypsin-like protease)가 작용하는 것으로 알려졌다(Beyler and Zaneveld, 1982; Perreault et al., 1982; Benau & Storey, 1987, 1988). 한편 Ca^{2+} 은 정자의 운동양상의 고활성화(hyperactivation)와 침체반응, 정자-난자 결합의 유지에 필수적이며(Heffener et al., 1980), 트립신유사효소의 활성을 나타내기 위해 Ca^{2+} 이 필수적이라는 보고(Schill, 1974)등은 트립신유사효소가 정자와 난자의 결합에 작용하고 있음을 의미한다. 정자의 원형질막 표면에 존재하는 galactosyltransferase가 정자-난자 결합에 관여하는 것으로 알려져 있는데(Shur & Hall, 1982), 수정능력부여 과정에서 이 효소의 활성을 억제하는 물질들이 정자로부터 유리된 후 효소활성을 나타내 투명대표면에 존재하는 수용체에 결합하는 것으로 알려졌다(Lopez et al., 1985; Benau & Storey, 1988). Glucose를 비롯한 여러 종류의 탄수화물이 정자-난자 결합을 경쟁적으로 억제하며(Rosati et al., 1980; Lambert, 1984; Shalgi et al., 1986; Macek & Shur, 1988; Boldt et al., 1989; Parish et al., 1989), 정자표면에 존재하는 다양한 antigenic substance(Peterson et al., 1982; Lakoski et al., 1988), 정자의 밀도(Niwa & Chang, 1974; Tsunoda & Chang, 1975; Nagai et al., 1984), 운동성(Katz et al., 1986; Baltz & Cardullo, 1989)등이 배우자간의 결합에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 정자가 난자의 원형질막과 융합한 직후 난자에서 방출된 피질과립(cortical granule)내에 여러효소는 투명대 단백질의 조성을 변화시켜 또다른 정자의 투명대관입을 막아 다수정을 방지하게 된다(Bleil et al., 1981). 양의 미성숙난자에서 다수정이 빈번히 일어나는 것으로 알려져 있으며(Crozet & Dumont, 1984), 난자의 성숙과정에서 일어나는 피질과립의 변화는 수정 직후에 일어나는 투명대 반응에 영향을 미치는 것으로 알려졌다(Cran & Cheng, 1985).

본 실험에서는 위와 같은 요소들 가운데 정자의 수정능력부여 과정에서 외부로 유출되는 정자의 원형질막 단백질과 침체내부의 트립신유사효소가 정자-난자 결합에 미치는 영향을 알아보기 위해 기본배양액내에서 정자를 배양

하거나 초음파로 분쇄한 후 원심분리하여 얻은 조정배양액내에서 정자와 난자의 결합을 조사하였으며 조정배양액내의 트립신유사효소의 활성을 측정하였다. 또한 체외에서 미성숙난자, 성숙난자, 수정란, 2-세포배아에 정자의 결합을 유도하여 난자의 성숙과 발생단계에 따른 투명대의 변화가 정자-난자 결합에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 정자의 수획

생후 3개월된 건강한 수컷 생쥐(ICR strain)를 경추파괴로 도살하여 미부부정소를 적출하여 기본배양액(BWW, Biggers et al., 1971)내에서 세척하여 혈액을 제거한 후 핀셋으로 압력을 가하여 정자를 수획하였다. 이 정자현탁액을 상온에서 10분간 원심분리($1,000 \times g$)하는 방법으로 2회 세척한 후 기본배양액으로 현탁액 혹은 0.4% bovine serum albumin(BSA, fraction V, Sigma)이 첨가된 기본배양액으로 현탁시킨 후 검정하여 운동성을 갖는 정자가 $5-10 \times 10^7$ sperm/ml이 되도록 현탁액내 정자의 밀도를 조정하였다.

2. 배양액의 준비

준비된 정자현탁액 일부는 1ml씩 배양접시(24-well, Nunc)에 옮겨 배양기($37^\circ C$, 5% CO_2 in 95% air)에서 60분간 배양하였고(Fraser, 1977), 세척된 정자현탁액의 다른 일부는 $4^\circ C$ 에

Table 1. Preparation of the conditioned media with or without BSA by means of incubation or sonication of sperm suspension

Medium	BSA(0.4%)	Preparation	
		Incubation (60 min)	Sonication (10 min)
M	-	-	-
Mi	-	+	-
Ms	-	-	+
MB	+	-	-
MBi	+	+	-
MBs	+	-	+

M, BWW (Biggers et al., 1971); B, BSA; i, supernatant from incubated sperm suspension; s, supernatant from sonicated sperm suspension; +, treatment; -, not treatment.

서 10분간 초음파로 분쇄하였다(표 1). 위와같이 처리한 정자현탁액은 원심분리(20,000×g, 60min, 4°C)한후 상등액만을 Millipore membrane (pore size 0.22μm)으로 여과하여 0.3ml씩 분주하여 사용시까지 -20°C에서 보관하였다. 준비된 조정배양액은 2주 이내에 사용하였다.

3. 정자의 수정능력부여

전술한 방법으로 2회 반복하여 세척한 정자 pellet에 기본배양액 혹은 BSA를 0.4% 포함한 기본배양액 2ml을 넣어 배양기로 옮기고 10분간 swim-up시킨 후 상층부의 1ml을 수확한 후 검경하여 운동성을 갖는 정자가 5-10 × 10⁶ sperm/ml이 되도록 현탁액내 정자의 밀도를 조정하였다. 준비된 정자현탁액 50μl를 배양접시에 4곳에 정치시킨 후 실험군에 따라 같은 양의 조정배양액과 섞어 Brinster(1963)의 방법으로 파라핀유(Wako, Japan)를 덮어 0-150분간 배양하여 수정능력을 부여하였다(Fraser, 1977).

4. 난자의 준비 및 처리

성숙난자를 얻기 위해 생후 3개월된 암컷 생쥐(ICR strain)의 복강에 PMSG(Sigma) 5 IU와 hCG(Serono) 5 IU를 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG주사 후 각각 16시간 후에 경추파괴로 도살한 후 수란관에서 난자-난구복합체(oocyte-cumulus complex, OCC)를 수확하였다.

미성숙난자(immature oocyte)는 적출한 난소에서 난포를 터뜨려 핵막(germinal vesicle)이 뚜렷한 난자만 수확하였다. 전술한 방법으로 과배란을 유도한 암컷을 수컷과 교미시켜 hCG주사후 각각 16시간 및 40시간에 도살하여 수란관으로부터 수정란과 2-세포배아를 수확하였다. 수확한 난자와 배아는 0.1% (w/v) hyaluronidase (Sigma)와 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone(PVP, Merck)을 포함한 배양액내에서 5분간 처리하여 난구세포를 분리한 후 새로운 배양액으로 3회 세척하였다. 미성숙난자, 수정란, 2-세포배아들도 이와 동일하게 처리하였다.

5. 트립신유사효소의 활성도 측정

정자를 처리하여 얻은 조정배양액의 단백질은 bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma)를 표준 단백질로 삼아 정량하였다(Bradford, 1976). 트립신유사효소의 활성도 측정은 Beyler와 Zaneveld(1982)의 방법을 이용하였다. Ben-

zoyl DL-arginine ethyl ester(BAEE, Sigma)를 기질로하여 50mM BAEE, 50mM Tris-HCl(pH 8.0)이 들어있는 기질용액 3ml에 준비된 조정배양액 100μl를 혼합하여 25°C에서 반응시켜 BAEE의 분해산물인 ethyl ester의 흡광도를 253nm의 파장에서 2분 간격으로 30분간 측정하여 분해된 BAEE의 농도를 기준으로 조정배양액내 트립신유사효소의 활성도(mIU/ml)를 환산하였다.

6. 정자-난자 결합의 유도

정자의 밀도에 따른 정자-난자 결합을 알아보기 위해 10³-10⁷ sperm/ml 밀도의 정자현탁액을 60분간 배양하여 수정능력을 부여한 후 정자-난자 결합을 유도하였다. 수정능력부여 시간에 따른 결합을 알아보기 위해 10⁶ sperm/ml의 정자현탁액을 0-150분간 배양하면서 30분 간격으로 난자와 결합을 유도하였다. 결합 유도시간에 따른 정자-난자 결합을 알아보기 위해 정자의 수정능력부여 후 10-120분간 난자와 함께 배양하여 결합을 유도하였다. 각 실험에서 정자현탁액 100μl에 12-14개의 난자를 넣어 결합을 유도하였다.

7. 정자-난자의 결합의 계수

정자와 난자의 결합을 유도한 후 고정액(3% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)으로 30분간 고정하였다. 난자에 결합하지 않은 배양액내의 정자들은 mouth pipette를 이용하여 제거한 후 도립현미경시야(X100)에서 난자의 중앙부위에 초점을 맞추어 투명대에 결합한 정자를 계수하였다. 통계적 유의성 검증은 Student-t test로 하였으며 p<0.05인 경우 유의하다고 보았다.

결 과

1. 정자의 밀도와 수정능력부여 및 수정 시간에 따른 정자-난자 결합

정자를 0-150분간 배양하여 수정능력부여를 유도하면서 시간에 따라 난자를 넣어 수정을 유도한 경우 60분간 정자를 배양하여 난자와 결합을 유도하였을때 가장 많은 수(46 sperm/egg)의 정자가 난자의 투명대에 결합하였다(그림 1).

60분간 배양하여 수정능력을 부여한 정자의 밀도가 10³-10⁶ sperm/ml 범위 일때 정자의 농도에 따라 투명대에 결합한 정자의 수가 비례적으로

증가하였으며 그 이상의 밀도(10^7 sperm/ml)에서는 난자의 표면이 투명대에 결합한 정자로 포화

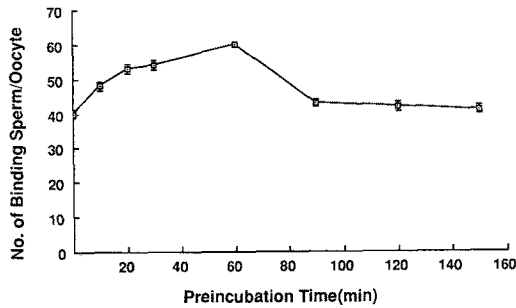


Fig. 1. Sperm binding according to the preincubation (capacitation) time. Cumulus-free oocytes were inseminated with the preincubated sperm suspension (10^6 sperm/ml) in BWB containing 0.4% BSA for 60 min. Values are mean \pm SE (n=20).

되는 것으로 나타났다. 수정능력이 부여된 정자의 밀도가 10^6 sperm/ml인 현탁액에 난자를 함께 배양하여 결합을 유도한 경우 수정을 유도한 시간

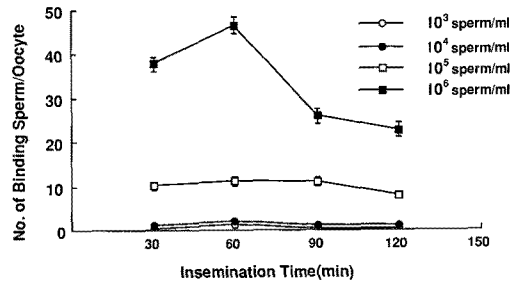


Fig. 2. Sperm binding according to the sperm concentration and insemination time. Cumulus-free oocytes were inseminated with the sperm preincubated in BWB containing 0.4% BSA for 60 min. Values are mean \pm SE (n=10).

Table 2. Binding rate (%) of sperm to the immature, mature and fertilized eggs, and 2-cell embryos

Stage of Egg	N	Mean No. of Sperm/Egg	Binding rate (%)	Significancy
Immature(I)	17	57.7	126.5 ± 3.2	
Mature(M)	17	44.8	100.0	vs I, ***
Fertilized(F)	4	24.7	49.8 ± 1.7	vs I, ***; vs M, ***
2-Cell Embryo	47	22.0	50.0 ± 1.6	vs I, ***; vs M, ***

Sperm concentration was 10^6 /ml. Values are mean \pm SE. ***, $p < 0.001$.

Table 3. Trypsin-like enzyme activities in the various media

Medium	Activity (mIU/ml)	Significancy
M	2.17 ± 0.22	
Mi	1.27 ± 0.50	
Ms	4.86 ± 0.27	vs M, **; vs Mi, **
MB	1.27 ± 0.43	vs Ms, **
MBi	1.12 ± 0.19	vs M, *; vs Ms, ***
MBs	3.37 ± 0.29	vs M, *; vs Mi, *; vs MB, *; vs MBi, **

Values are mean \pm SE. n=4; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Table 4. Binding rate (%) of sperm capacitated for 60 min in the mixture of equal volume of conditioned medium (M, Mi, MB, MBi) and BWB containing 0.4% BSA

Medium	Mean No. of Binding	Sperm/Egg rate (%)	Significancy
M	39.6	100.0	
Mi	17.9	50.8 ± 5.6	vs M, ***
MB	41.3	106.4 ± 4.0	vs Mi, **
MBi	20.5	57.2 ± 6.6	vs M, **; vs MB, **

Values are mean \pm SE. n=4; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Table 5. Binding rate(%) of sperm capacitated for 60 min in the mixture of equal volume of conditioned medium(M, Ms, MB, MBs) and BWW containing 0.4% BSA

Medium	Mean No. of Sperm/Egg	Binding rate(%)	Significancy
M	21.1	100.0	
Ms	29.7	149.2 ± 8.2	vs M, **
MB	25.3	119.9 ± 2.5	vs M, **; vs Ms, *
MBs	31.6	154.1 ± 15.7	vs M, *; vs MB, ***

Values are mean ± SE. n=17; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Table 6. Binding rate(%) of sperm capacitated for 60 min in the mixture of equal volume of conditioned medium(M, Mi, MB, MBi) and BWW

Medium	Mean No. of Sperm/Egg	Binding rate(%)	Significancy
M	8.9	100.0	
Mi	17.4	196.3 ± 16.6	vs M, **
MB	21.7	324.8 ± 104.2	
MBi	18.3	247.8 ± 55.0	

Values are mean ± SE. n=4; **, p<0.01.

Table 7. Binding rate(%) of sperm capacitated for 60 min in the mixture of equal volume of conditiond medium(M, Ms, MB, MBs) and BWW

Medium	Mean No. of Sperm/Egg	Binding rate(%)	Significancy
M	4.6	100.0	
Ms	17.0	396.3 ± 77.4	vs M, *
MB	26.2	595.7 ± 75.8	vs M, **
MBs	32.6	803.6 ± 282.3	

Values are mean ± SE. n=2; *, p<0.05; **, p<0.01.

에 따라 60분까지 결합이 점차 증가하였고 그 이후 감소하였다(그림 2).

2. 난자의 발생단계에 따른 결합

미성숙난자에는 성숙난자에 비해 유의하게(p<0.01) 많은(126.5%) 정자가 결합하였다. 수정란 및 2-세포배아에는 각각 성숙난자의 49.8%와 48.9%의 정자가 결합하였으며(p<0.001), 수정란과 2-세포배아간에 유의한 차이는 없었다(표 2, Plate I)

3. 배양액내 트립신유사효소의 활성화도

5×10^7 sperm/ml의 정자현탁액을 1시간 동안 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액 Mi와 MBi의 트립신유사효소의 활성화도(1.27, 1.12 mIU/ml)는 배양액 M과 MB의 활성화도(2.17, 1.27 mIU/ml)와 유의한 차이를 보이지 않았다. 정자현탁액을 초음파로 분쇄하여 원심분리한 상등

액 Ms와 MBs의 효소활성도(4.86, 3.37 mIU/ml)는 배양액 M과 MB보다 유의하게(p<0.01, p<0.05) 높았다. Ms의 효소활성도가 MBs보다 유의하게(p<0.05) 높았다(표 3).

4. 조정배양액으로 처리한 정자와 난자의결합

BSA를 함유한 배양액에 준비된 정자 현탁액을 같은 양의 Mi 및 MBi와 혼합하여 60분간 배양한 후 결합을 유도한 경우 배양액 M과 MB로 처리한 경우보다 유의하게(p<0.001) 결합이 감소하였다(Plate II). 조정배양액 Ms 및 MBs와 혼합하여 60분간 배양한 경우 배양액 M과 MB에서보다 유의하게(p<0.001, p<0.05) 많은 수의 정자가 결합하였다(표 4, 5).

한편 BSA를 포함하지 않은 배양액으로 준비한 정자현탁액을 같은 양의 Mi 및 Ms와 혼합하여 60분간 배양한 후 결합을 유도하였을 때 배양액 M으로 처리한 경우보다 유의하게(p<0.

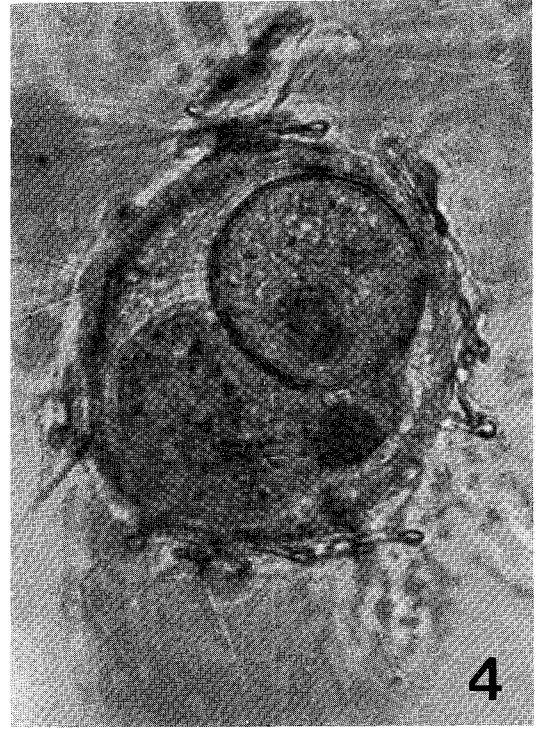
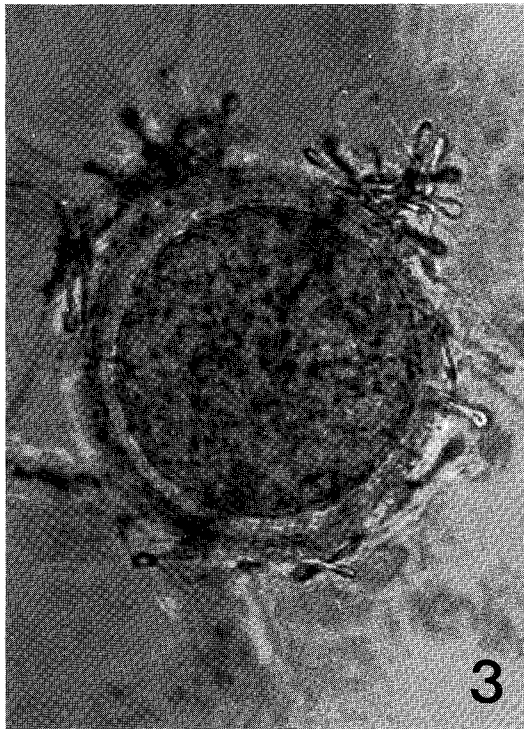
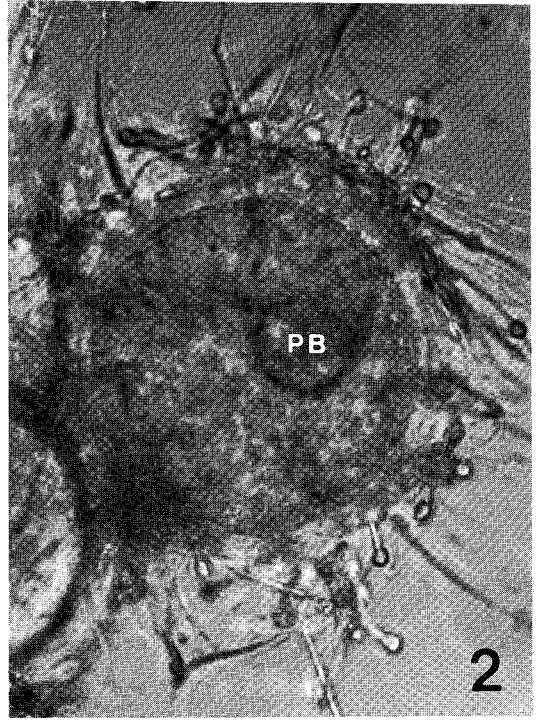
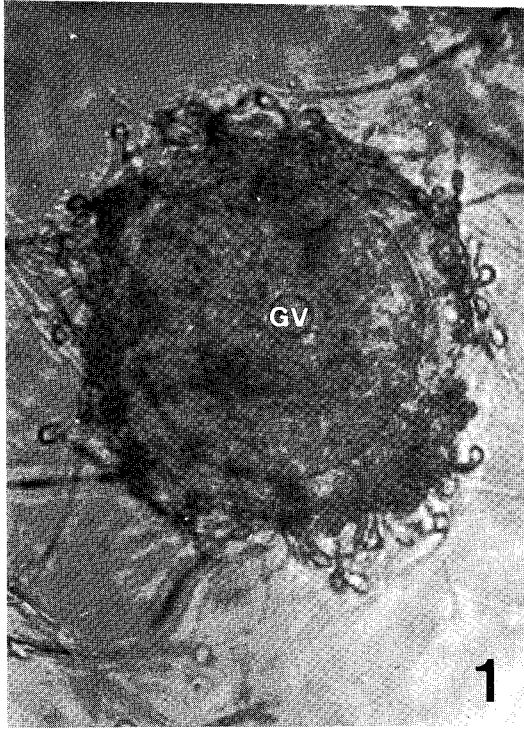


Plate I. Microphotographs of sperm binding to the immature, mature and fertilized eggs and 2-cell embryos(X400). 1. Sperm binding to the immature egg with germinal vesicle(GV). 2. Sperm binding to the mature egg with 1st polar body(PB). 3. Sperm binding to the fertilized egg. Note markedly decreased sperm binding when compared to the immature and mature eggs. 4. Sperm binding to 2-cell embryo. Note markedly decreased sperm binding when compared to the immature eggs.

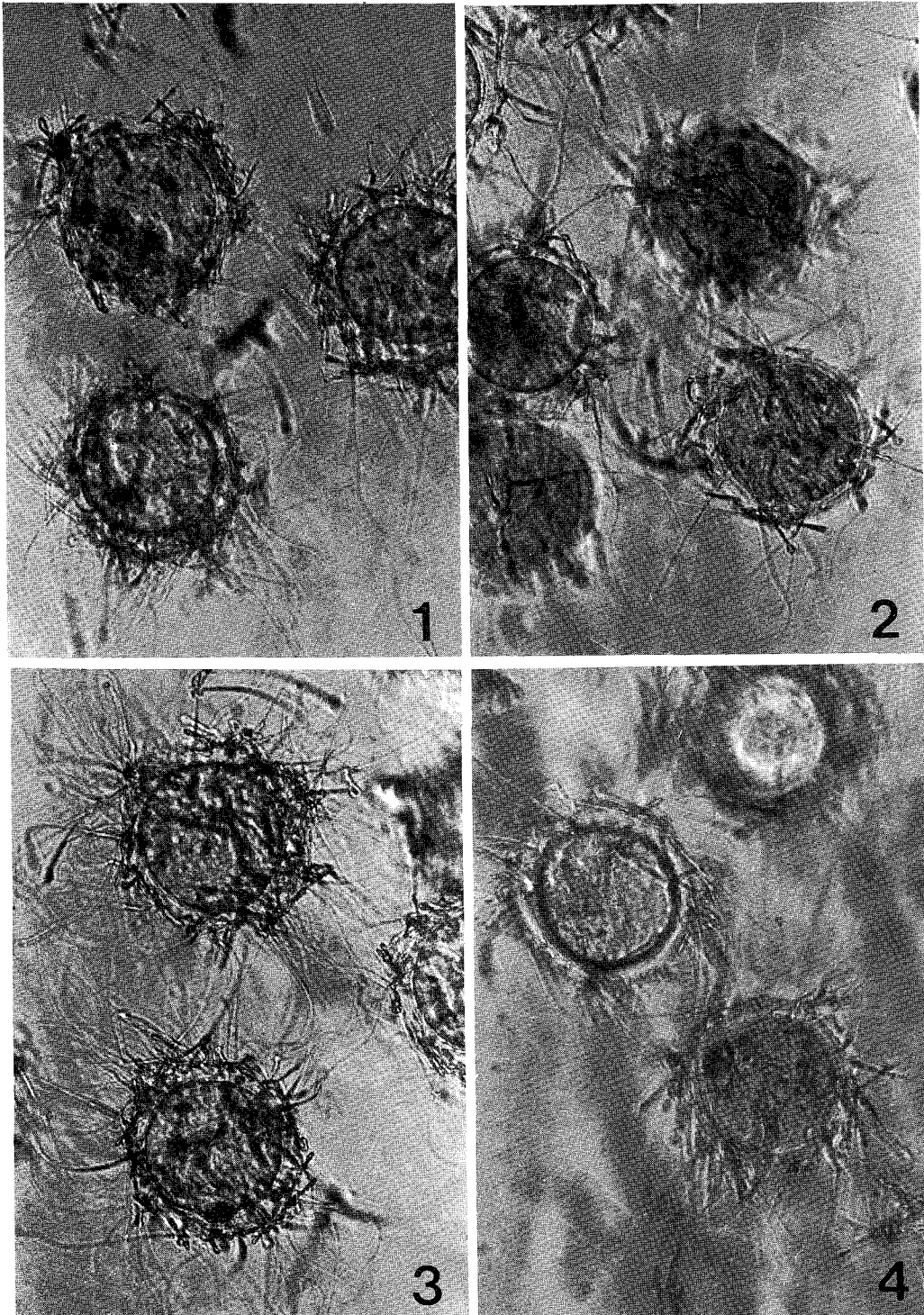


Plate II Microphotographs of sperm binding to eggs according to the sperm preincubation in the several kinds of media (X200). 1. Sperm binding to the eggs in the plain medium M. 2. Sperm binding to the eggs in the conditioned medium Mi. Note decreased sperm binding when compared to that of M. 3. Sperm binding to the eggs in the conditioned medium MB. 4. Sperm binding to the eggs in the conditioned medium MBi. Note decreased sperm binding when compared to that of MB.

05) 많은 수의 정자가 결합하였다.

조정배양액 MBI로 처리한 후 결합을 유도한 경우 배양액 MBs로 처리한 경우보다 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(표 6, 7). 조정배양액 MBs로 처리하였을 때 결합이 증가하는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다.

고 찰

생쥐의 정자와 난자의 초기 상호작용은 정자 표면의 수용체에 난자 투명대단백질인 ZP3의 O-linked oligosaccharide가 결합하고 2차적으로 난자 투명대단백질 ZP2와 정자가 매우 단단한 결합을 형성하여 정자가 난자에서 떨어지지 않고 침체반응을 일으켜 투명대를 관입하는 것으로 알려져 있다(Wassarman, 1988). 이러한 결합에는 정자의 표면에 존재하는 galactosyltransferase(Shur & Hall, 1982)와 trypsin inhibitor sensitive site(Saling, 1981; Benau and Storey, 1987)등이 난자투명대의 수용체로 알려지고 있다.

Protease inhibitor를 정자에 일정시간 처리한 후 배우자간의 결합을 유도하였을 때 정자와 난자의 결합이 억제되었으며(Saling, 1981), 정자와 난자 사이에 초기의 느슨한 결합이 형성된 후에는 protease inhibitor의 처리효과가 없었다는 사실은 정자와 난자의 결합에 protease가 작용하고 있음을 의미한다. 투명대에 결합한 정자가 계속적으로 결합을 유지하기 위해 Ca^{2+} 이 필수적이며(Heffener et al., 1980), Ca^{2+} chelating agent인 EGTA를 첨가한 배양액에서 정자와 난자의 결합이 억제되었으며(Soldani & Rosati, 1987), 침체효소가 활성을 나타내기 위해서 Ca^{2+} 이 필요한 것으로 알려져 있다(Parrish & Polakoski, 1981).

본 실험에서 정자를 초음파로 분쇄한 후 원심분리하여 얻은 상층액내에서 트립신유사효소의 활성이 높게 나타났으며 이 조정배양액내에서 정자의 수정능력부여를 유도한 경우 배우자간의 결합이 증가하였는데 배양액내로 유리되어 나온 정자의 침체효소가 정자와 난자의 결합을 증가시킨 것으로 사료된다. 한편 glucose가 정자의 수정능력부여를 촉진하는 heparin의 효과를 억제한다는 보고(Parrish et al., 1989)와 여러 종류의 탄수화물을 첨가한 배양액내에서 정자와 난자의 결합이 억제된다는 보고(Shalgi et al., 1986) 등은 배우자간의 결합에 탄수화물이

관여하고 있음을 의미하며, 정자의 수정능력부여 과정중 원형질막에 존재하는 antigenic한 당단백질들이 정자로부터 유리되는 것으로 알려져 있다(Shur & Hall, 1982). 본 실험에서 정자의 수정능력부여를 유도하기 위하여 기본배양액에 준비한 고밀도(5×10^7 sperm/ml)의 정자 현탁액을 60분간 배양한 후 원심분리하여 얻은 상층액내에서 $15 \mu\text{g/ml}$ 의 단백질이 검출되었고 이 조정배양액내에서 정자를 배양한 후 배우자간의 결합을 유도하였을 때 결합이 감소한 것은 수정능력부여 과정에서 정자로부터 유리되어 나온 물질들이 정자-난자 결합을 억제하는 것으로 사료된다.

BSA를 첨가한 배양액내에서 정자의 수정능력부여를 유도한 경우 이 배양액내에는 정자의 응집현상(agglutination)을 촉진하는 물질이 유출되는 것으로 알려져 있다(Hamano et al., 1989). 본 실험에서 BSA가 포함된 배양액내에서 정자를 60분간 배양한 후 원심분리한 상층액으로 정자를 처리한 경우 정자들 사이에 응집현상이 강하게 일어났는데 정자의 수정능력부여 과정에서 외부로 유출된 정자의 세포막 분획이나, 수정능력을 잃어가거나 죽은 정자에서 일어나는 가침체반응(false acrosome reaction)으로 인해 정자로부터 분비된 침체효소 및 여러 종류의 단백질이 정자의 응집현상을 일으킨 것으로 사료되며 이런 물질은 정자와 난자의 결합을 억제하는 것으로 사료된다.

정자와 난자의 결합을 유도한 후 난자에 결합한 정자를 계수하는 실험방법에 있어서 지금까지는 난자의 직경보다 약간 더 큰 내경 $100 \mu\text{m}$ 정도의 micropipette로 난자를 흡입 방출하는 과정을 반복하여 미부착 정자를 제거한 후에 투명대에 결합한 정자를 계수하여 정자-난자 결합의 척도로 간주해왔다(Shalgi et al., 1986). 그러나 아직까지 정자가 난자의 투명대에 결합하는 강도에 대한 기준이 모호한 상태이며 flushing할 때 정자가 부착된 난자에 가해지는 힘이 일정하지 않으므로 실험조건에 따라 난자에 결합한 정자의 수를 계수하는 과정에서 차이를 나타낼 수 있다. 본 실험에서는 정자-난자 결합을 임의적으로 구분하지 않기 위해 결합이 유도된 난자를 고정된 후 결합을 깨뜨릴 수 있는 물리적 충격을 최소화하여 난자에 결합한 정자의 수를 계수하였다(Sacco et al., 1989). 이러한 방법은 실험조건에 따라 결합한 정자의 수를 계수하는데 발생하는 차이를 최소화 할

수 있을 것으로 생각된다.

정자현탁액을 60분간 배양한 후 난자와 결합을 유도하였을 때 정자-난자 결합이 가장 높았으며, 배양액내의 정자의 밀도에 비례하여 결합한 정자의 수가 증가하였다. 이는 정자의 수정능력부여와 정자-난자 결합간에는 밀접한 관계가 있으며 정자밀도의 증가에 따른 접촉기회의 증가(Tsunoda & Chang, 1975; Nagai et al., 1984)가 정자-난자 결합을 증가시킨 것으로 사료된다. 정자와 난자의 결합유도 시간에 따라 결합이 증가하다가 60분에서 정점에 달한 것은 배양액내에서 정자의 운동성의 변화가 정자와 난자의 결합에 관련되어 있다는 것을(Katz & Yanagimachi, 1981; Katz et al., 1986) 뒷받침 한다.

수정난자에서는 다수정(polyspermy)을 방지하기 위해 피질과립이 방출되어 투명대반응이 일어나는데(Barros & Yanagimachi, 1972), 난자의 성숙과정 중에 일어나는 피질과립의 변화는 다수정을 방지하기 위한 것으로 알려져 있다(Cran & Cheng, 1985).

피질과립의 성숙도와 다수정방지에 관한 연구로 Crozet와 Dumont(1984)은 sheep 난포내 미성숙난자를 교미된 직후의 암컷 수관관에 옮겨 수정을 유도하였을 때 다수의 정자가 난자를 관입하여 세포질내로 관입한 이후에도 정상적인 피질과립의 방출이 일어나지 않았다고 보고하였으며, 수정시기를 지나친 난자의 경우 방출된 피질과립이 난자의 원형질막 표면에서 투명대쪽으로 확산되지 않는다는 보고(Gomez et al., 1984)등이 있으며, 이러한 원인으로 난자의 피질층에 성숙한 피질과립의 수가 부족하거나 난자의 원형질막에 충분히 근접하지 못한 상태로 존재하기 때문인 것으로 보고되고 있다(Sathananthan & Trounson, 1982). 본 실험의 결과 성숙난자에 비해 미성숙난자에 더 많은(126%) 정자가 결합한 것은 미성숙난자의 경우 피질과립의 미성숙으로 인해 수정이 일어난 후 피질과립의 방출이 충분치 않거나 지연되어 효과적인 투명대반응을 막아 난자 주위에 존재하던 정자들이 수정 이후에도 계속적으로 미성숙난자의 투명대에 결합한 것으로 사료된다. 한편 수정란 및 2-세포배아에도 성숙난자에 비하여 각각 49%와 48%정도의 정자가 결합한 것은 투명대반응이 일어난 후에도 정자가 결합할 수 있는 부위가 투명대표면에 존재하고는 있으나 투명대 관입에 필요한 정자의 효소활성

이 억제되었거나 투명대 단백질의 변화로 인해 정자의 투명대 관입이 일어나지 않는 것으로 사료된다

결론적으로 정자가 수정능력을 부여 받는 동안 정자의 원형질막에서는 정자-난자 결합을 억제하는 물질들이 외부로 유출되는데 이러한 물질은 정자와 난자의 결합에 관계된 정자의 원형질막 당단백질들이 난자의 투명대와 결합하는 것을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 정자의 트립신유사효소는 정자-난자 결합을 증가시키는 작용을 나타내며 배양액내에 첨가된 BSA는 정자-난자 결합을 증가시키는 것으로 사료된다. 미성숙난자에서는 투명대반응이 효과적으로 일어나지 못해 성숙난자에 비하여 더 많은 정자가 투명대에 결합하는 것으로 사료되며 이는 미성숙난자에서 일어나는 다수정의 원인으로 사료된다.

결 론

본 연구는 수정과정에서 생쥐 정자와 난자의 상호작용에 관한 연구의 일환으로서 정자의 밀도, 수정능력부여 시간 및 수정유도 시간, 난자의 성숙 및 발생단계, 정자의 첨체내에 존재하는 트립신유사효소, 그리고 배양액내 BSA등이 정자-난자 결합에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다.

정자-난자 결합은 정자 농도에 비례적으로 증가하였고 수정능력부여 시간 및 수정유도 시간이 각각 60분될 때 가장 높았다. 수정능력이 부여되는 동안 정자로부터 정자-난자 결합을 억제하는 물질이 유출되었으며 첨체반응시 분비되는 트립신유사효소는 정자-난자 결합을 증가시켰다. 배양액내 BSA는 정자-난자 결합에 양성적 효과를 나타냈다. 난자의 성숙 과정에서 일어나는 투명대의 물리화학적 변화는 정자-난자 결합을 억제하여 다수정을 방지하는 것으로 추론된다.

인 용 문 헌

- Austin CR : Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Biol Sci Ser* 1951, B4, 581-592.
- Baltz JM, Cardullo RA : On the number and rate of formation of sperm-zona bonds in the mouse. *Gamete Res* 1989, 24, 1-8.

- Benau C, Yanagimachi R : Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J Exp Zool* 1972, 180, 251-266.
- Benau DA, Storey BT : Characterization of the mouse sperm plasmamembrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biol Reprod* 1987, 36, 282-292.
- Benau DA, Storey BT : Relationship between two types of mouse sperm surface sites that mediate binding of sperm to the zona pellucida. *Biol Reprod* 1988, 39, 235-244.
- Beyler SA, Zaneveld LDJ : Inhibition of *in vitro* fertilization of mouse gametes by proteinase inhibitors. *J. Reprod Fert* 1982, 66, 425-431.
- Bhattacharyya, AK, Goodpasture JC, Zaneveld LDJ : Acrosin of mouse spermatozoa. *Am J Physiol* 1979, 237, E40-E44.
- Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG : The culture of mouse embryos *in vitro*. In : Daniel JC Jr ed. *Methods in mammalian embryology*. New York : Academic Press, 1971, 86-116.
- Bleil JD, Beall CF, Wassarman PM : Mammalian sperm-egg interaction : Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Devel Biol* 1981, 86, 189-197.
- Bleil JD, Wassarman PM : Autoradiographic visualization of the mouse's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* 1986, 102, 1363-1371.
- Boldt J, Howe AM, Parkerson JB, Gunter LE, Kuehn E : Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biol Reprod* 1989, 40, 887-896.
- Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248-254.
- Brinster RL : A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963, 32, 205-208.
- Chang MC : Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951, 168, 697-698.
- Cran DG, Cheng WTK : Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gamete Res* 1985, 11, 311-391.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW : Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988, 38, 234-244.
- Crozet N, Dumont M : The site of the acrosome reaction during *in vivo* penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res* 1984, 10, 97-105.
- Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM : Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Devel Biol* 1984, 106, 243-255.
- Florman HM, Wassarman PM : O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 1985, 41, 313-324.
- Fraser RL : Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fert* 1977, 62, 63-72.
- Gomez MI, Santolaya RC, Cabada MO : Exocytosis of cortical granules from activated-oocyte of the toad, *Bofo arenarum*. *Cell Tissue Res* 1984, 237, 191-194.
- Hamano S, Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y : *In vitro* capacitation of boar ejaculated spermatozoa : Effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension. *Gamete Res* 1989, 24, 483-489.
- Heffner LJ, Saling PM, Storey BT : Separation of calcium effects on motility and zona binding ability in mouse spermatozoa. *J Exp Zool* 1980, 212, 53-59.
- Katz DF, Yanagimachi R : Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod* 1981, 25, 785-791.
- Katz DF, Cherr GN, Lambert H : The evolution of hamster sperm motility during capacitation and interaction with the ovum vestments *in vitro*. *Gamete Res* 1986, 14, 333-346.
- Lakoski KA, Carron CP, Cabot CL, Saling PM : Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm : Response to zona pellucida develops coincident with modifica-

- tion of M42 antigen. *Biol Reprod* 1988, 38, 221-233.
- Lambert H: Role of sperm-surface glycoproteins in gamete recognition in two mouse species. *J Reprod Fert* 1984, 70, 281-284.
- Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper JH, Shur BD: Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J Cell Biol* 1985, 101, 1501-1510.
- Macek MB, Shur BD: Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. *Gamete Res* 1988, 20, 93-109.
- Nagai T, Niwa K, Iritani A: Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J Reprod Fert* 1984, 70, 271-275.
- Niwa K, Chang MC: Optimal concentration and minimal number of spermatozoa for fertilization *in vitro* of rat eggs. *J Reprod Fert* 1974, 40, 471-474.
- O'Rand MG: Sperm egg recognition and barriers to interspecies fertilization. *Gamete Res* 1988, 19, 315-328.
- Parrish RF, Polakoski KL: Stimulation of proteolytic activity of boar sperm acrosin by divalent metal ions. *J Reprod Fert* 1981, 62, 417-422.
- Parrish JJ, Susko-Parrigh JL, First NL: Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989, 41, 683-699.
- Perreault SD, Zirkin BR, Rogers J: Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* 1982, 26, 343-351.
- Peterson RN, Robl JM, Dziuk PJ, Russell LD: The effects of antisperm plasma membrane antibodies on sperm-egg binding, penetration, and fertilization in the pig. *J Exp Zool* 1982, 223, 79-81.
- Poirier GR, Robinson R, Richardson R, Hinds K, Clayton D: Evidence for a binding site on the sperm plasma membrane which recognizes the murine zona pellucida: A binding site on the sperm plasma membrane. *Gamete Res* 1986, 14, 235-243.
- Robinson R, Richardson R, Hinds K, Clayton D, Poirier GR: Features of a seminal protease inhibitor-zona pellucida-binding component on murine spermatozoa. *Gamete Res* 1987, 16, 217-228.
- Rosati F, De Santis R: Role of the surface carbohydrates in sperm-egg interaction in *Ciona intestinalis*. *Nature* 1980, 283, 762-764.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, Matzat PD: Porcine zona pellucida: Association of sperm receptor activity with the α -glycoprotein component of the $M_r=55,000$ family. *Biol Reprod* 1989, 41, 523-532.
- Saling PM: Involvement of trypsin like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1981, 78, 6231-6235.
- Saling PM, Bedford JM: Absence of species specificity for mammalian sperm capacitation *in vitro*. *J Reprod Fert* 1981, 63, 119-123.
- Sathananthan AH, Trounson AO: Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 1982, 6, 225-234.
- Schill W-B: Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa. *Fertil Steril* 1974, 25, 703-712.
- Shalgi R, Matityahu A, Nebel L: The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol Reprod* 1986, 34, 446-452.
- Shur BD, Hall NG: A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 1982, 95, 574-579.
- Soldani P, Rosati F: Sperm-egg interaction in the mouse using live and glutaraldehyde-fixed eggs. *Gamete Res* 1987, 18, 225-235.
- Tsunoda Y, Chang MC: Penetration of mouse eggs *in vitro*: Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa. *J Reprod Fert* 1975, 44, 139-142.
- Wassarman PM: Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 1988, 57, 415-442.
- Yanagimachi R: Penetration of guinea pig sper-

matozoa into hamster eggs *in vitro*. *J
Reprod Fert* 1972, 28, 477-488.
Yanagimachi R, Phillips DM: The status of

acrosomal caps of hamster spermatozoa im-
mediately before fertilization *in vivo*. *Ga-
mete Res* 1984, 9, 1-19.
