

## 생쥐 부정소 정자의 성숙과정에서 Phosphatase 활성도 변화

김문규 · 윤현수 · 김종흡 · 김성례\*

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 이화여자대학교 의과대학 의학과\*

생쥐의 정자가 부정소에서 성숙하는 동안 phosphatase 활성도의 변화를 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다. 효소의 활성도는 Ernst(1975)의 방법을 변용하여 측정하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

부정소의 두부내 정자와 미부내 정자의 단백질 함량은 각각  $59.1 \pm 8.4(\text{mg}/10^9\text{sperm})$ ,  $14.1 \pm 2.1(\text{mg}/10^9\text{sperm})$ 으로 나타났다. 기본 반응액에서 나타난 두부내 정자의 효소 활성도를 100%로 할 때, 미부내 정자의 활성도는 ALPase가 29.2%, ATPase가 44.9% 그리고 ACPase가 53.8%였으며, 초음파로 정자를 분쇄하였을 경우에 ALPase는 16.5%, ATPase는 33.3% 그리고 ACPase는 38.7%였다. 따라서 미부내 정자의 phosphatase 활성도는 두부내 정자에 비하여 현저히 감소하였다. 그리고 부정소의 미부내 정자에서  $\text{K}^+$ -dependent ALPase와 ATPase의 활성도는 두부내 정자에 비하여 유의하게 감소하였으며, 초음파로 정자를 분쇄하였을 때  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphatase의 활성도는 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로 보아 생쥐의 정자가 부정소에서 성숙하는 동안 phosphatase의 활성도가 감소하는 것은 성숙과정에서 정자가 수정능력(fertilizing capability)을 획득하는 데 어떤 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

**KEY WORDS: Phosphatase activity, Epididymal maturation, Mouse spermatozoa**

포유동물의 정자는 정소에서 형성된 후 부정소를 통과하는 동안 성숙하게 된다. 정자의 성숙과정에서 원형질막을 비롯한 세포내 소기관들에는 여러가지 변화가 일어나는 것으로 알려져 왔다. 즉, 정자의 직진운동에 필요한 단백질(forward motility protein)을 포함한 여러 종류의 부정소 특이단백질이 정자의 원형질막에 부착되고(Acott and Hoskins, 1981; Klinefelter and Hamilton, 1985; Olson *et al.*, 1987), carnitine 이 정자내로 흡수되며(Casillas *et al.*, 1984), 원형질막의 지질 조성이 변하고(Schlegel *et al.*, 1986), 탄수화물과 단백질의 함량과 조성이 변하는 것으로 알려져 있다(Hall and Killian, 1987; Kim *et al.*, 1989). 이러한 변화들은 수정에 필요한 정자의

운동성, 침체반응, 난자에의 부착능력 등과 깊은 관계가 있는 것으로 알려지고 있다(Cooper, 1986).

그리고 정자의 기능과 관련된 효소들에 관하여도 많은 연구들이 보고된 바 있다. 생쥐의 정자가 수정시 난자를 인식하게 되는 과정은 정자의 표면에 존재하는 galactosyltransferase에 난자의 투명대에 존재하는 당류가 결합됨으로써 유발되는 것으로 알려져 있는데(Lopez *et al.*, 1985) 생쥐의 정자가 부정소에서 성숙되는 동안 galactosyltransferase는 침체부위로 집중되며(Scully *et al.*, 1987), 돼지의 정자에서는 에너지대사에 관여하는 lactate dehydrogenase isozyme들의 활성이 종류에 따라 증가하거나 감소되고(Atreja and Anand, 1985), 염소의 정자에서 phospholipase와 lysophospholipase의 활성이 감소하며(Egbunike *et al.*, 1986), 쥐의 정자에서 glycosidase의

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

활성은 정자가 부정소의 체부를 통과할 때까지 증가하다가, 미부로 이동하면서 감소하는 것으로 알려졌다(Hall and Killian, 1987)

한편 포유동물의 정자에서 phosphatase는 Dott와 Dingle (1968)에 의해 돼지와 양의 정자에서 분리된 세포질 잔기에 acid phosphatase (ACPase)가 다량으로 존재하는 것이 알려진 후 원형질막에 존재하는 ATPase를 중심으로 연구되어 왔다. 토끼와 돼지의 정자에는 수정시 난자의 투명대 관입과 원형질막 융합에 관여하는 것으로 추측되는 ACPase가 침체 하단에 존재하며 (Teichman and Bernstein, 1971), 토끼와 사람의 정자에는 ATPase 및 alkaline phosphatase (ALPase)가 원형질막과 침체막에 존재하는데 이 효소는  $Ca^{2+}$ 의 흡수기능을 갖고(Gordon, 1978), hamster의 정자에 존재하는 ATPase는 침체를 산성으로 유지하는 기능을 갖는 것으로 알려진 바 있다(Working and Meizel, 1981, 1982). 또한 guinea pig의 정자에는 운동에 필요한  $Ca^{2+}$ -dependent ATPase가 미부의 측사부분에 존재하는 것으로 보고된 바 있고(Gordon et al., 1983), guinea pig의 정자에서 수정능력 획득 전 후에 원형질막과 침체외막에 활성을 나타내는  $Mg^{2+}$ -ATPase가 침체반응이 일어난 후에는 불활성화 되는 것으로 보고된 바 있다(Gordon et al., 1978; Usui and Yanagimachi, 1986).

상기한 연구 보고들에 따르면, 정자에 존재하는 phosphatase는 정자에서  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  및  $H^+$  등의 수송에 관여하는데, 정자내로 흡수된  $Ca^{2+}$ 은 침체 반응시 침체내 다른 효소의 활성화에 필요하며, 다른 이온들은 침체내 산도유지 및 막전위를 형성하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그러나 생쥐의 정자에서 phosphatase에 관한 연구는 거의 없으며, 특히 정자가 부정소에서 성숙하는 동안 phosphatase의 활성과 그 변화에 관한 연구가 미진한 상태이다. 따라서 본 연구는 생쥐의 정자가 부정소에서 성숙하는 동안 phosphatase활성의 변화양상을 알아봄으로써 부정소 정자의 성숙기작을 밝히는 데 기초자료를 얻고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 정자의 채취

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 3-4개월 된 생쥐(ICR strain)의 수컷으로 체중이 30g 내외의 건강한 것을 사용하였다.

생쥐를 경추파괴로 도살한 후 부정소를 적출하여, 생리식염수(0.85% NaCl)로 세척한 후 두부와 미부로 분리하였으며, 분리한 부정소 각 부위는 생리식염수내에서 몇 군데 가위질을 한 후 핀셋으로 압력을 가하여 정자를 수확하였다. 수확된 정자는 생리식염수로 현탁시킨 후 200G에서 10분 동안 원심분리하여 2회 세척하였다. 세척한 부정소의 두부내 정자는 약  $0.5 \times 10^5$ (sperm/ml), 미부내 정자는 약  $1.4 \times 10^6$ (sperm/ml)의 농도가 되도록 생리식염수를 가하여 희석하였다. 그리고 정자의 내부에 존재하는 효소의 활성을 측정하기 위하여 Hall과 Killian(1987)이 사용한 초음파진탕(ultrasonication) 방법으로 정자를 분쇄하였으며, 상기한 모든 과정은 0~4°C에서 실시하였다.

### phosphatase 활성도 측정

정자의 효소 활성도 측정은 Ernst(1975)의 방법을 변용하여 실시하였는데, Table 1과 같이 효소의 기질로 *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP)와 무기이온을 첨가한 각 반응액 1.6ml에 정자 현탁액 0.4ml을 첨가하여 잘 섞은 후 37°C에서 10, 20, 40, 60 그리고 120분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 30% trichloroacetic acid (TCA) 용액 1ml을 가하여 5분간 효소의 활성을 중지시킨 후, 2N NaOH 용액 2ml을 가하여 재발색시켰으며, 800G에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 효소의 분해산물인 *p*-nitrophenol(*p*-NP)의 양은 일련 농도의 *p*-nitrophenol (0-250  $\mu$ M, Sigma) 용액을 표준으로 삼아 파장 410nm에서 분광광도계 (spectrophotometer, Shimadzu UV-150-02)로 측정하였으며, 시료내 단백질의 정량은 bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 표준 단백질로 사용하여 Lowry(1951)의 방법을 이용하였다.

그리고 각 실험군에서 나타난 측정치의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

## 결 과

본 실험에서 나타난 정자의 단백질 함량은 부정소의 두부내 정자에서  $59.1 \pm 8.4$  ( $\text{mg}/10^9$  sperm)로 나타났고, 미부내 정자에서는  $14.0 \pm 2.3$  ( $\text{mg}/10^9$  sperm)으로 나타나 미부 정자에서 현저히 감소하였다( $P < 0.01$ ).

각 phosphatase의 활성도는 효소반응에 의한 p-NP의 생성이 일정한 증가를 나타내는 반응시간 40분의 활성도를 Mean  $\pm$  SE ( $\mu$  moles p-NP / mg protein / hour)로 나타냈다(Figs. 1, 2, 3).

기본 반응액에서 측정된 정상적인(intact) 정자

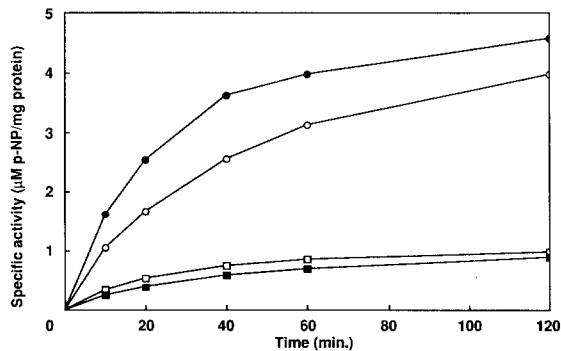


Fig. 1. Alkaline phosphatase activity of the intact and sonicated spermatozoa according to the epididymal regions in mouse. ○ caput intact, □ cauda intact, ● caput sonicated, ■ cauda sonicated.

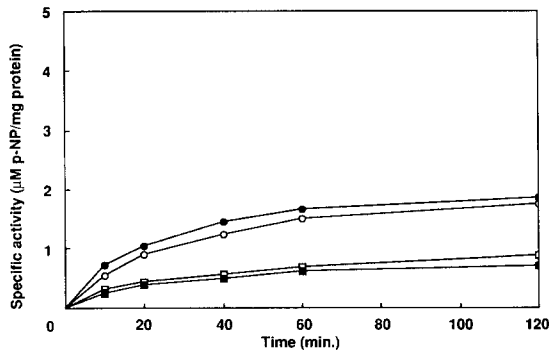


Fig. 2. Adenosine triphosphatase activity of the intact and sonicated spermatozoa according to the epididymal regions in mouse. ○ caput intact, □ cauda intact, ● caput sonicated, ■ cauda sonicated.

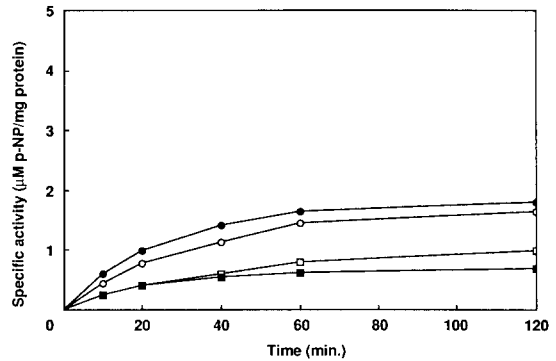


Fig. 3. Acid phosphatase activity of the intact and sonicated spermatozoa according to the epididymal regions in mouse. ○ caput intact, □ cauda intact, ● caput sonicated, ■ cauda sonicated.

의 phosphatase 활성도는 다음과 같다. ALPase의 활성도는 부정소의 두부내 정자에서  $3.83 \pm 0.29$ 로 나타났고, 미부내 정자는  $1.12 \pm 0.14$ 로 나타났다(Table 2). ATPase의 활성도는 두부내 정자에서  $1.85 \pm 0.13$ 으로 나타났고, 미부내 정자에서는  $0.83 \pm 0.04$ 로 나타났다(Table 3). ACPase의 활성도는 두부내 정자에서  $1.69 \pm 0.08$ 로 나타났고, 미부내 정자에서는  $0.91 \pm 0.11$ 로 나타났다(Table 4). 따라서 각 phosphatase의 활성도는 공통적으로 부정소의 두부내 정자에 비하여 미부내 정자에서 현저히 낮은 것으로 나타났다( $p < 0.01$ , Table 2).

그리고 정자의 세포질 내부에 존재하는 phosphatase의 활성을 알아보기 위하여, 초음파로 분쇄한 정자에서 측정된 두부내 정자의 ALPase 활성도는  $5.41 \pm 0.34$ 로 나타났고, ATPase의 활성도는  $2.16 \pm 0.09$ 로 나타났으며, ACPase의 활성도는  $2.12 \pm 0.14$ 로 나타나 정상적인 정자보다 현저히 높았으나( $p < 0.01$ ), 미부내 정자에서 측정된 ALPase와 ATPase의 활성도는 정상적인 정자보다 낮게 나타났으며( $p < 0.05$ ), ACPase의 활성도는 정상적인 정자에 비하여 차이가 없었다.

또한 본 실험에서 나타난 무기이온( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )에 대한 phosphatase 활성의 의존도는 기본 배양액에서 나타난 활성도를 대조군(100%)으로 삼아 이들 이온이 포함되지 않은 배양액에서의 활성도를 비교하였는데 그 결과는 다음과 같다.

**Table 1.** The component and composition of the reaction media for determination of phosphatases activities in mouse spermatozoa

Component	Conc. (mM)	Reaction (media)				
		Basic	K <sup>+</sup> -free	Mg <sup>2+</sup> -free	Ca <sup>2+</sup> -free	Ion-free
*Tris-HCl	100	+	+	+	+	+
<i>p</i> -NPP	5	+	+	+	+	+
KCl	10	+	—	+	+	—
MgCl <sub>2</sub>	10	+	+	—	+	—
CaCl <sub>2</sub>	10	+	+	+	—	—

\*:The buffered reaction media were adjusted at pH 5.0, 7.0 and 9.0 for acid, neutral and alkaline phosphatase, respectively.; + and — mean inclusion and omission in the reaction media, respectively

**Table 2.** Alkaline phosphatase activities of mouse epididymal spermatozoa in the various reaction media

Spermatozoa		Reaction media				
		Basic	K <sup>+</sup> -free	Mg <sup>+</sup> -free	Ca <sup>2+</sup> -free	Ion-free
I	CP	3.83±0.29 <sup>a</sup> (100.0)	3.42±0.27 (89.3)	2.17±0.05** (56.7)	3.81±0.14 (99.5)	1.68±0.14** (43.9)
	CD	1.12±0.14 <sup># #</sup> (100.0)	1.11±0.07 (99.1)	0.68±0.09* (60.7)	1.12±0.09 (100.0)	0.64±0.12** (57.1)
S	CP	5.41±0.34 (100.0)	4.83±0.45 (89.3)	2.74±0.34** (50.6)	4.51±0.33 (83.3)	0.65±0.09** (12.0)
	CD	0.89±0.29 <sup># #</sup> (100.0)	0.83±0.13 (93.3)	0.56±0.08* (62.9)	0.69±0.06 (77.5)	0.39±0.06** (43.8)

I: intact, S: sonicated, CP: caput, CD: cauda, a: Mean±SE(μ moles *p*-NP/mg protein/hour), n = 4, Numerical numbers in parenthesis indicate the percentage for alkaline phosphatase activities in the basic reaction media.; Significance of cationic effect (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01); Significance of CD vs CP(# #: p < 0.01)

ALPase는 정상적인 두부내 정자에서 반응액에 Mg<sup>2+</sup> 및 K<sup>+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 효소의 활성이 각각 43.4%, 10.6% 감소되었고, 분쇄한 두부내 정자에서 11.9%의 활성이 감소되었다. 그리고 정상적인 미부내 정자에서 Mg<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 39.2%의 활성이 감소되었고, 분쇄한 미부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup> 과 Ca<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 각각 37.3%, 23.2%의 활성이 억제되었다(p < 0.05, Table 2).

ATPase는 정상적인 두부내 정자에서 Mg<sup>2+</sup>,

K<sup>+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 각각 58.1%, 11.4%의 활성이 감소되었고, 분쇄한 두부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 각각 50.1%, 16.1%, 11.3%의 활성이 감소되었다. 그리고 정상적인 미부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 40.0%의 활성이 감소되었고, 분쇄한 두부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 각각 44.3%, 13.8%의 활성이 감소되었다(p < 0.05, Table 3).

ACPase는 정상적인 두부내 정자에서 Mg<sup>2+</sup> 이

**Table 3.** ATPase activities of mouse epididymal spermatozoa in the various reaction media

Spermatozoa		Reaction media				
		Basic	K <sup>+</sup> -free	Mg <sup>+</sup> -free	Ca <sup>2+</sup> -free	Ion-free
I	CP	1.85±0.13 <sup>a</sup> (100.0)	1.64±0.09 (88.6)	0.77±0.14** (41.6)	1.93±0.11 (104.3)	0.76±0.14** (41.0)
	CD	0.83±0.04 <sup># #</sup> (100.0)	0.76±0.03 (91.6)	0.51±0.07* (61.4)	0.82±0.07 (98.8)	0.31±0.03** (37.3)
S	CP	2.16±0.09 (100.0)	1.97±0.13 (97.2)	1.07±0.09** (49.4)	1.81±0.18* (85.4)	0.78±0.11** (36.1)
	CD	0.72±0.07 <sup># #</sup> (100.0)	0.66±0.05 (91.7)	0.41±0.04* (56.9)	0.62±0.04* (86.1)	0.31±0.02** (43.1)

I: intact, S: sonicated, CP: caput, CD: cauda, a: Mean±SE( $\mu$  mole *p*-NP/mg protein/hour), n = 4. Numerical numbers in parenthesis indicate the percentage for ATPase activities in the basic reaction media.; Significancy of cationic effect (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01), Significancy of CD vs CP(# #: p < 0.01)

**Table 4.** Acid phosphatase activities of mouse epididymal spermatozoa in the various reaction media

Spermatozoa		Reaction media				
		Basic	K <sup>+</sup> -free	Mg <sup>+</sup> -free	Ca <sup>2+</sup> -free	Ion-free
I	CP	1.69±0.08 <sup>a</sup> (100.0)	1.62±0.65 (95.9)	1.05±0.16* (62.1)	1.63±0.08 (96.4)	0.84±0.09** (49.7)
	CD	0.91±0.11 <sup># #</sup> (100.0)	0.86±0.08 (94.5)	0.61±0.09* (67.0)	0.88±0.06 (96.7)	0.38±0.05** (39.6)
S	CP	2.12±0.14 (100.0)	1.92±0.21 (90.6)	1.19±0.09** (56.1)	1.58±0.11* (74.5)	0.71±0.11** (33.5)
	CD	0.82±0.07 <sup># #</sup> (100.0)	0.78±0.06 (95.1)	0.45±0.03* (54.9)	0.68±0.06 (82.9)	0.25±0.05** (30.5)

I: intact, S: sonicated, CP: caput, CD: cauda. a: Mean±SE( $\mu$  moles *p*-NP/mg protein/hour), n = 4. Numerical numbers in parenthesis indicate the percentage for acid phosphatase activities in the basic reaction media.; Significancy of cationic effect (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01), Significancy of CD vs CP(# #: p < 0.01)

온을 첨가하지 않았을 때 37.7%의 활성이 감소되었으나, 분쇄한 두부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 각각 43.9% 25.5%의 활성이 감소되었다. 그리고 정상적인 미부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 33.3%의 활성이 감소되었고, 분쇄한 미부내 정자에서는 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않았을 때 각각 45.3%, 16.2%의 활성이 억제되었다(p <

0.05, Table 4).

따라서 정상적인 정자와 분쇄된 정자에서 각 phosphatase 공통적으로 Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatase의 활성이 가장 큰 것으로 나타났으며, 분쇄한 정자에서 각 phosphatase는 공통적으로 Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase의 활성이 정상적인 정자에 비하여 증가되었다(p < 0.05).

## 고 찰

포유동물의 정자는 부정소에서 성숙되는 동안 탄수화물, 단백질, 지질 등의 양적인 증감이 생기거나, 특성이 다른 물질로 전환되는 생리 생화학적 변화를 일으킨다(Zaneveld, 1982; Voglmayr *et al.*, 1983; Young *et al.*, 1985; Hall and Killian, 1987). 이러한 변화로 인하여 정자에 존재하는 효소들의 활성도와 존재부위 등이 달라지게 된다(Atreja and Anand, 1985; Egbunike *et al.*, 1986; Scully *et al.*, 1987; Hall and Killian, 1987). 따라서 정자가 부정소에서 성숙하는 동안 여러 phosphatase 활성도의 변화를 알아보는 것은 정자의 운동성, 수정시 침체반응 및 원형질막 융합 등 정자의 수정능력이 향상되는 것과 관련하여 매우 중요하다.

본 실험에서 성숙이 이루어진 것으로 추측되는 부정소의 미부내 정자의 단백질 함량은 두부내 정자에 비하여 현저히 감소하였는데, 이는 돼지와 쥐(Hall and Killian, 1987) 그리고 원숭이와 돼지(Zaneveld, 1982)에서 보고된 바와 일치하는 양상을 나타내고 있으며, 그 원인은 성숙과정에서 정자의 세포질 잔기가 분리되는 것이 주된 원인으로 사료되고, 정자에 존재하는 단백질이 성숙중에 부정소액 내로 유리되는 것도 정자의 단백질 감소에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

그리고 기본 반응액에서 각 phosphatase의 활성도는 부정소의 두부내 정자에 비하여 미부내 정자에서 공통적으로 현저히 감소하였는데, 그 이유는 세포질 잔기에 존재하던 효소가 분리되어 부정소액 내로 유리되거나, 성숙과정에서 부정소액으로 분비되는 acrosome stabilizing factor 등을 비롯한 부정소액내의 물질들이 성숙중인 정자의 표면에 부착됨으로써 phosphatase가 불활성화되는 것으로 사료된다. 그리고 이러한 효소의 활성도 변화는 ALPase가 세포 내외로 물질의 수송에 관여하고, ATPase는 세포내에 물질대사에 필요한 ATP를 분해한다는 기능 등을 고려할 때, 미성숙한 두부내 정자에서 물질대사가 활발한 것으로 추측할 수 있다. 또한 본 실험에서 나타난 생쥐 정자의 phosphatase 활성도 변화는, 쥐의 정자에서

phosphatase의 한 종류인 ecto-ATPase가 부정소 성숙과정에 변화하는 양상(Majumder, 1981)과 동일한 양상을 나타내고 있다.

한편 반응액에 첨가된 무기이온에 의하여 나타난 효소의 활성도는 두부내 정자와 미부내 정자에서 서로 다른 것으로 나타났다. 즉 정상적인 두부내 정자에서 ALPase와 ATPase의 활성에는  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ -dependent phosphatases가 주로 활성을 나타냈고, 미부내 정자에서는 각 phosphatase 공통적으로  $Mg^{2+}$ -dependent phosphatase 만이 주된 활성을 나타냈으며,  $K^+$ -dependent한 것은 유의성있는 활성을 보이지 않았다. 이는 미부내 정자에서 각 효소들의 활성이 감소된 것을 고려할 때 성숙과정에서 phosphatase의 활성이 변화하는 양상은 isozyme에 따라 다른 것으로 사료된다.

그리고 정자의 내부에 존재하는 phosphatase의 활성도를 알아보기 위해 초음파로 분쇄한 두부 및 미부내 정자의 활성도는 정상적인 정자와 비교하여 각 phosphatase 공통적으로  $Ca^{2+}$ -dependent phosphatase의 활성도가 높은 것으로 나타났는데 그 이유는 guinea pig 정자에서 미부의 axoneme에 존재하는 ATPase가  $Ca^{2+}$ -dependent 하다는 Gorden 등(1983)의 보고와 쥐, 토끼 및 돼지의 침체 외막에 존재하는 ATPase가  $Ca^{+}$ -dependent 하다는 보고(Gorden, 1978; Santos-Sacchi and Gorden, 1980; Ashraf *et al.*, 1982)들을 고려할 때 각 phosphatase 공통적으로  $Ca^{2+}$ -dependent phosphatase는 주로 침체막 등을 비롯한 정자의 세포내부에 존재하는 것으로 사료된다.

또한 기본 반응액에서 분쇄된 두부내 정자의 효소 활성도가 정상적인 정자의 활성도보다 더 높게 나타났으며, 미부내 정자에서는 분쇄된 정자에서 오히려 낮게 나타났다. 이는 두부내 정자에서 분리되지 않은 세포질 잔기에 존재하는 효소에 의한 것으로 사료되며, 미부내 정자에서는 침체내에 존재하는 효소에 의하여 phosphatase가 분해되어 활성도가 감소된 것으로 사료된다.

이상의 결과를 살펴볼 때 정자의 부정소 성숙과정에서 phosphatase의 활성이 감소하는 것은 정자에서 잔유 세포질의 분리에 의한 구조적인 변화와 깊은 관련이 있으며, 이러한 변화는 성숙 후 수정능력(fertilizing capability)이 증진되는 것에

큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그 외에도 현재 여러 효소의 활성과 존재부위의 변화에 대한 연구를 진행하고 있으며 그 결과는 정자의 부정소성숙기작을 설명하는데 좋은 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

### 인용문헌

- Acott, T. S., and D. D. Hoskins, 1981. Bovine sperm forward motility proteins: binding to epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* **24**: 234-240.
- Ashraf, M., R. N. Peterson, and L. D. Russell, 1982. Activity and location of cation-dependent ATPase on the plasma membrane of boar spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **107**: 1273-1278.
- Atreja, S. K. and S. R. Anand, 1985. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. *J. Reprod. Fert.* **74**: 687-691.
- Casillas, E. R., P. Villalobos, and R. Gonzales, 1984. Distribution of carnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation. *J. Reprod. Fert.* **72**: 197-201.
- Cooper, T. G., 1986. Function of the Epididymis and its Secretory Product. In: *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization.* (Cooper, T. G., ed.) Springer-Verlag, New York. pp. 117-230.
- Dott, H. M. and J. T. Dingle, 1968. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp. Cell Res.* **52**: 523-540.
- Egbunike, G. N., W. Branscheid, J. Pfisterer, and W. Holtz, 1986. Changes in porcine sperm lactate dehydrogenase isozymes during sperm maturation. *Andrologia* **18**: 108-113.
- Ernst, S. A., 1975. Transport ATPase cytochemistry: ultrastructural localization of potassium-dependent and potassium-independent phosphatase activities in rat kidney cortex. *J. Cell Biol.* **66**: 586-608.
- Gordon, M., 1978. Localization of phosphatase activity on the membranes of the mammalian sperm head. *J. Exp. Zool.* **185**: 111-120.
- Gordon, M., P. V. Dandeker, and P. R. Eager, 1978. Identification of phosphatase on the membranes of guinea pig sperm. *Anat. Rec.* **191**: 123-134.
- Gordon, M., E. G. Morris and R. J. Young, 1983. The localization of  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Ca^{2+}$  binding proteins in the flagellum of guinea pig sperm. *Gamete Res.* **8**: 49-55.
- Hall, J. C. and G. J. Killian, 1987. Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biol. Reprod.* **36**: 709-718.
- Kim, M. K., H. S. Yoon, K. W. Choi, and Y. D. Yoon, 1989. Lamination of epididymis and electrophoretic patterns of proteins in epididymal fluid during sexual maturation in mouse. *Korean J. Zool.*, **32**: 264-274.
- Klinefelter, G. R. and D. W. Hamilton, 1985. Synthesis and secretion of proteins by perfused caput epididymal tubules and association of secreted proteins with spermatozoa. *Biol. Reprod.* **33**: 1017-1027.
- Lopez, L. C., E. M. Bayna, D. Litoff, N. L. Shaper, J. H. Shaper, and B. D. Shur, 1985. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.* **101**: 1501-1510.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrouch, L. A. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 145-147.
- Majumder, G. C., 1981. Enzymic characteristics of ecto-adenosine triphosphatase in rat epididymal intact spermatozoa. *Biochem. J.* **195**: 103-110.
- Olson, G. E., M. R. Lifscics, V. P. Winfrey, and J. M. Rifkin, 1987. Modification of the rat sperm flagellar plasma membrane during maturation in the epididymis. *J. Androl.* **8**: 129-147.
- Santos-Sacchi, J. and M. Gordon, 1980. Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. *J. Cell Biol.* **85**: 798-803.
- Schlegel, R. A., R. H. Hammerstedt, G. P. Cofer, K. Kozarsky, D. Freidus, and P. Williamson, 1986. Changes in the organization of the bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* **34**: 379-391.
- Scully, N. F., J. H. Shaper, and B. D. Shur, 1987. Spatial and temporal expression of cell surface galactosyltransferase during mouse spermatogenesis and epididymal maturation. *Dev. Biol.* **124**: 111-124.
- Teichman, R. J. and M. H. Bernstein, 1971. Fine structure localizations of acid phosphatase in rabbit and bull sperm heads. *J. Reprod. Fert.* **27**: 243-248.
- Usui, N. and R. Yanagimachi, 1986. Cytochemical localization of membrane-bound  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activity in guinea pig sperm head before and during the acrosomal reaction. *Gamete Res.* **13**: 271-280.
- Voglmayr, J. K., G. Fairbanks, and R. G. Lewis, 1983. Surface glycoprotein changes in ram spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* **29**: 767-775.
- Working, P. K. and S. Meizel, 1981. Evidence that an

- ATPase functions in the maintenance of the acidic pH of hamster acrosome. *J. Biol. Chem.* **256**: 4708-4711.
- Working, P. K. and S. Meizel, 1982. Preliminary characterization of a  $Mg^{2+}$ -ATPase in hamster sperm head membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **104**: 1060-1065.
- Young, L. G., B. T. Hinton, and K. G. Gould, 1985. Surface changes in chimpanzee sperm during epididymal transit. *Biol. Reprod.* **32**: 399-412.
- Zaneveld, L. D. J., 1982. The Epididymis. In: *Biochemistry of Mammalian Reproduction and Fertilization.* (Zaneveld, L. D. J., ed.), New York, pp. 37-64.
- Young, L. G., B. T. Hinton, and K. G. Gould, 1985. (Accepted November 20, 1989)

---

#### Changes in Phosphatase Activities of Mouse Epididymal Spermatozoa during Maturation

Moon Kyoo Kim, Hyun Soo Yoon Chong Heup Kim and Sung Rye Kim\*(Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea and College of Medicine\*, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea)

The change of phosphatase activities of the epididymal spermatozoa has been examined during epididymal maturation in mouse. The quantitative analysis of phosphatase activities have been carried out using the method modified by Ernst(1975). The results of experiment were summarized as the followings.

Total protein of the caput epididymal spermatozoa(CPS) was measured as  $59.1 \pm 8.4$ (mg/10<sup>9</sup> spermatozoa), and that of the cauda epididymal spermatozoa(CDS) was  $14.0 \pm 2.3$ (mg/10<sup>9</sup> spermatozoa). When phosphatase activities of the CDS in basic reaction medium were 29.2% in alkaline phosphatase, 44.9% in ATPase and 53.8% in acid phosphatase. The activities were eminently decreased in all CDS in contrast to those of CPS. The alkaline phosphatase and ATPase activities of K<sup>+</sup>-dependent were decreased in CDS when compared with caput epididymal spermatozoa, and alkaline phosphatase, ATPase and acid phosphatase activities of Ca<sup>2+</sup>-dependent were increased in homogenized spermatozoa when compared with intact spermatozoa.

From these results, it may be concluded that the decrease of phosphatases activities in spermatozoa during epididymal maturation may play some significant roles in acquiring fertilizing capability.