

마우스 부정소에서 Guanidinoacetate Methyltransferase의 발현

이 항 · 이문한
서울대학교 수의과대학

Guanidinoacetate Methyltransferase Expression in Mouse Epididymis

Hang Lee and Mun-Han Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT

Guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) catalyzes the last step of creatine biosynthesis and the resultant creatine plays an important role in cellular energy metabolism. GAMT is mainly found in liver, kidney as well as testis and epididymis. We have localized the site of creatine biosynthesis in mouse epididymis by immunoperoxidase staining of GAMT using anti-GAMT antibody. GAMT is extensively expressed in the microvilli of epididymal epithelial cells and also expressed weakly in the cytoplasm of the cells. The staining of GAMT was most prominent in the microvilli of proximal caput epididymis and the intensity was progressively diminished as the epididymal tubule proceeds toward caudal part. The result suggests that GAMT or Cr might be involved in sperm function and/or maturation process in epididymis.

Key words: Epididymis, Guanidinoacetate Methyltransferase, Creatine biosynthesis, Microvilli, Sperm maturation.

서 론

Creatine (Cr) 과 phosphocreatine (PCr) 은 척추동물의 세포 에너지대사에서 중요한 역할을 하는 화합물으로써 creatine kinase (CK) 의 매개에 의하여 고에너지 인산화합물의 저장, 완충역할을 하는 것으로 인식되어 있다 (Watts, 1973; Walker, 1979). 따라서 creatine 과 phosphocreatine 은 특히 세포 내 에너지 요구량의

변동이 심한 세포, 즉 근육과 신경세포 등에 많이 존재하고 있다 (Beis & Newsholme, 1975; Ennor & Morrison, 1958; Marescau *et al.*, 1992). 한편 최근 설치류의 응성생식기도의 세포외액에 Cr 과 PCr 이 높은 농도로 존재하고 있다는 사실이 보고되었다 (Lee *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1991). 예를 들어 마우스의 정낭선액에는 5.6 $\mu\text{mol/g}$ 수준의 PCr 과 22.8 $\mu\text{mol/g}$ 수준의 Cr 이 존재하며, 특히 이 정낭선액의 PCr 은 세포외액에 PCr 이 존재하는 유일한 경우로 알려져 있다

본 연구는 1994, 1995년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학) 의 일부지원에 의하여 연구되었음.

(Lee *et al.*, 1988). 이러한 정낭선액에서의 Cr /PCr의 축적은 androgen에 의하여 조절된다 (Lee *et al.*, 1991). 많은 동물의 정소와 정관에도 Cr이 존재한다는 것은 오래 전부터 알려져 있었으며 (Bodansky, 1935; Navon *et al.*, 1985), 아마도 Cr은 이들 조직의 관강내 세포외액에 존재하는 것으로 추정되고 있다 (Lee *et al.*, 1988). 비록 아직까지 이들 웅성생식수관에서 Cr이 하는 역할에 대하여 명확히 알려진 것은 없지만, 이들 조직에서 Cr과 PCr의 존재는 이들 화합물이 웅성생식 기능과 밀접한 연관이 있을 가능성을 시사하고 있다.

포유류에서 Cr은 두 단계의 효소반응에 의하여 합성된다 (Walker, 1979). 첫째 단계에서 arginine의 guanidino기가 glycine으로 옮겨져 guanidinoacetate를 합성하며 이 반응은 L-arginine:glycine amidinotransferase (transamidinase; EC 2.1.4.1)에 의하여 촉매된다. 두 번째 단계에서 S-adenosylmethionine:guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT; EC 2.1.1.2.)에 의하여 guanidinoacetate가 methylation되어 Cr을 합성한다. Cr 합성과정은 주로 간, 신장, 췌장 등에서 일어나며 Cr을 가장 많이 소모하는 골격근과 심장근에서는 Cr이 합성되지 않는다 (Walker, 1979). 이렇게 합성된 Cr은 일반적으로 혈류를 통하여 Cr이 필요한 기관으로 이동하고, 이 곳에서 Cr transporter에 의하여 흡수, 사용되는 것으로 알려져 있다. 그러나 다른 조직과는 달리 웅성생식수관의 세포들은 자체적으로 Cr을 합성하여 이를 관강내로 분비하는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 Cr을 합성하는 최종단계의 효소인 GAMT가 웅성생식수관에 다량으로 존재하며 이들이 정소의 Sertoli cell과 부정소의 상피세포에 존재함이 본 실험에 의하여 보고되면서 알려지게 되었다 (Lee *et al.*, 1994). 본 실험에서는 부정소에서 다량으로 발현되고 있는 GAMT를 면역조직화학방법으로 더욱 국소화하여 Cr 합성이 일어나는 부위를 확인하고자 하였다. 그 결과, 특히 부정소 두부 근위부 상피세포의 미세융모(microvilli)에서 GAMT가 극히 강하게 염색되는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

성숙한 ICR 숫마우스 (14~16 주령, 대한실험동물)를 Sprando (1990)의 방법으로 관류하였다. 마취전 15분 경에 heparin 130 unit을 복강주사하고 20 mg/ml의 zylmazine과 100 mg/ml의 ketamine을 1:1로 섞은 용액을 근육 내 주사하여 마취를 유도하였다. 흉곽을 조심스럽게 절개한 후 PBS (phosphate-buffered saline, 2mM EDTA, pH 7.2)를 좌심실로 관류시키고 우심방을 절개하여 혈액이 흘러나오도록 하였다. 혈액이 완전히 PBS로 대체될 때까지 관류를 한 후 약 150 ml의 고정액으로 다시 약 15분간 관류를 계속하였다. 고정액은 0.1 M NaCacodylate, pH 7.3, 0.1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde의 조성을 사용하였다. 정소와 부정소를 취하여 같은 고정액으로 1시간 내지 밤새도록 후고정 (postfixation) 시켰다. 이후 고정된 조직들을 dry ice-ethanol 액에 냉각된 isopentane에 담그어 얼리었고, -70°C에 보관하였다가 절편을 만들었다.

조직절편은 -27°C의 cryostat에서 12 µm 두께로 절단하여 만들었다. 냉동절편들은 gelatin으로 입힌 slide에 녹여 입혔으며 -70°C에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 녹인 슬라이드 절편 위로 2-3 방울의 PBS를 떨어뜨리고 절편 주위에 Pap-pen (Daido Sangyo Co., Japan)으로 원을 그려 시약들이 번지지 않도록 하였다. 절편슬라이드들을 0.25% 과산화수소-PBS액에 30분간 배양하여 내인성 peroxidase를 불활화시키고 PBS로 5분간씩 3번 세척한 후 4°C에서 봉쇄액 (blocking solution, 10% normal goat serum, 0.2% Triton X-100이 들어있는 PBS)에 밤새도록 배양하여 2차항체의 비특이적 결합부위를 봉쇄 (blocking)하였다. 봉쇄된 절편들을 rabbit anti-pig GAMT antibody (affinity-purified; Ogawa *et al.*, 1988)를 봉쇄액에 76 mg/ml의 농도로 녹인 용액에서 4시간동안 실온에서 배양하였다. 대조군은 100 mg/ml의 normal rabbit IgG (af-

finity-purified, Zymed)에 같은 시간 배양하였다. 배양후 슬라이드들을 PBS로 10분간씩 3번 세척하고 나서 2차항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate (Bio-Rad)를 봉쇄액에 1:100으로 희석한 용액에 실온에서 1시간 동안 배양한 후 다시 PBS로 5분간씩 3번 세척하고 마지막으로 봉쇄액으로 5분간 세척하였다. 이후 슬라이드들을 diaminobenzidine (DAB, Kirkegard & Perry Laboratories) 용액에 15분간 담그어 발색시키었고 toluidine으로 2초간 대조염색한 후 PBS로 세척하여 Fluoromount-G (Fisher)로 봉입하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. 일차항체의 GAMT에 대한 특이성은 이미 보고되었다 (Ogawa *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1994). 특별한 언급이 없는 한 모든 시약은 Sigma에서 구입하였다.

결 과

Fig. 1은 부정소 두부 부분의 면역조직염색을 100배 배율로 관찰한 사진이다. "1"로 표시된 부위는 두부 부정소의 근위부분으로 상피세포의 높이가 가장 높으며 미세융모도 가장 발달되어 있고 관강의 크기가 가장 작은 반면, "2"로 표시된 부위는 두부 부정소의 원위부분으로 조금 더 넓은 관강을 가지고 상피세포와 미세융모의 높이는 "1"부위보다 낮다. 근위부분과 원위부분 모두 미세융모 부분이 강하게 염색된 것을 관찰할 수 있다. 토끼의 정상 면역글로블린을 1차항체로 사용한 대조군에서는 전혀 이러한 염색이 없었다 (Fig. 1A). 미세융모 부분의 강한 염색은 Fig. 2B의 400배 배율 사진에서 더욱 뚜렷이 관찰할 수 있었으며 역시 정상 대조군의 미세융모 부분에서는 전혀 염색이 되지 않았다 (Fig. 2A). 상피세포의 세포질에서도 대조군에서 관찰되지 않는 약간의 염색반응이 있었다 (Fig. 2B). 간질세포 (interstitial cells)에서도 아주 미약한 반응이 있었으나 이러한 간질세포의 반응은 대조군에서도 관찰되는 것으로 보아 비특이적인 반응으로 생각된다 (Fig. 2A와 2B). 미세융모의 염색은 부정소 미부로 갈수록

점점 약하여지는데 이것은 조직학적으로 미세융모의 발달정도가 미부로 갈수록 약하여지는 것과 일치한다. Fig. 3A (100배)와 3B (400배)는 부정소 미부에서의 면역염색 사진으로 넓은 관강과 낮은 미세융모, 이와 함께 약한 염색반응을 관찰할 수 있었다. 관강 내에서도 대조군에서는 관찰되지 않는 약간의 염색반응이 있었으나 이것이 강하게 반응하는 미세융모의 파편인지 혹은 정자세포인지는 확실하지 않다 (Fig. 3B).

고 찰

부정소의 상피세포는 근위부분에서 그 높이가 가장 높으며 부동섬모 (stereocilia)라고도 불리우는 미세융모도 근위부분에서 가장 잘 발달되어 있다 (Reid and Cleland, 1957). 그러나 부정소 원위부분과 미부 쪽으로 갈수록 상피세포의 높이는 점점 낮아지며 미세융모도 그 높이가 낮아진다. 미세융모는 상피세포의 표면적을 크게 증가시킴으로써 상피세포와 관강액 사이의 물질이동이 활발히 일어나도록 돕는 것으로 알려져 있다. 이러한 미세융모에 GAMT가 집중되어 발현되어 있는 것으로 보아 부정소에서의 Cr 합성은 대부분 상피세포의 미세융모에서 일어나고 있으며 이렇게 합성된 Cr은 아마도 관강 내로 분비되는 것으로 추측된다.

부정소 관강액에 실제로 Cr이 존재하는지 여부는 보고되어 있지 않으나, 정소에는 다량의 Cr이 존재하는 것으로 알려져 있고 이 Cr은 아마도 정세관강 (seminiferous tubule lumen) 내에 존재하는 것으로 생각된다 (Lee *et al.*, 1988). GAMT가 정소의 Sertoli cell에도 존재하므로 정세관 내의 Cr은 Sertoli cell에서 유래한 것으로 보인다 (Lee *et al.*, 1994). 그러므로 웅성생식수관의 상피세포들 (Sertoli cell과 부정소 상피세포)은 모두 Cr을 합성할 수 있는 능력을 가지며, 따라서 만일 부정소 상피세포에서 합성된 Cr이 관강 내로 분비된다면 정자세포는 정소에서 생성되어 부정소에서 성숙이 일어날 때까지 지속적으로 Cr과 접촉하고 있는 것이 된다. 한편 마우스와 랫드의 정낭선액에서도 고농도의 Cr

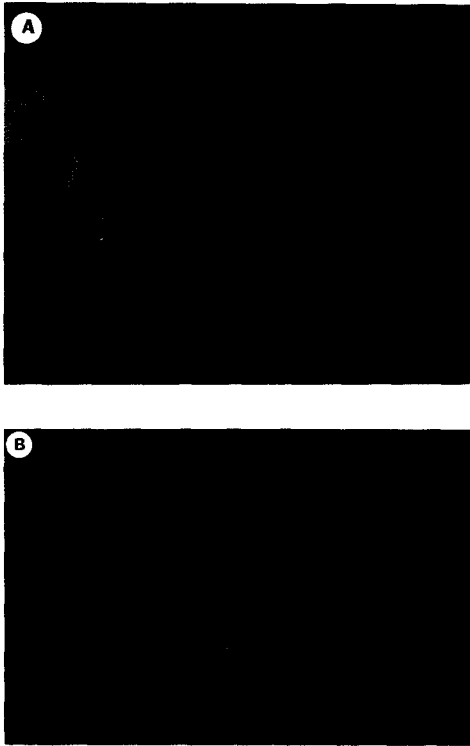


Fig. 1. Immunoperoxidase localization of GAMT in caput epididymis ($\times 100$).

The tissue slides were incubated either in normal rabbit IgG (A) or in anti-GAMT antibody (B) and processed for the immunoperoxidase detection as described in Materials and Methods. The immunostained slides were counterstained with toluidine. Symbols: 1, proximal caput epididymal region; 2, distal caput epididymal region; arrows, epithelial cells; arrowheads, microvilli; stars, interstitial tissues; asterisks, sperm cells in the lumen; open arrows, microvilli sloughed from the epithelium.



Fig. 2. Immunoperoxidase localization of GAMT in proximal caput epididymis ($\times 400$).

The experimental procedure is same as described in Fig. 1. A; slide incubated in normal rabbit IgG. B; slide incubated in anti-GAMT antibody. See Fig. 1 legend for symbols.

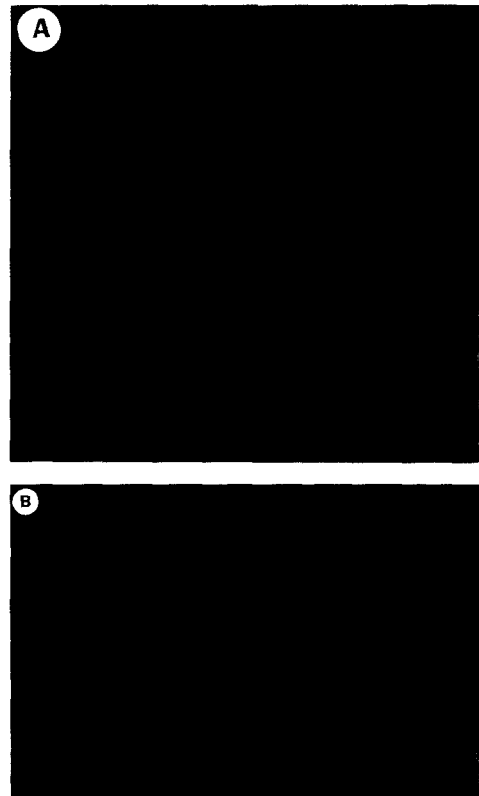


Fig. 3. Immunoperoxidase localization of GAMT in caudal epididymis (Panel A, $\times 100$; Panel B, $\times 400$).

The experimental procedure is same as described in Fig. 1. Both A and B are slides incubated in anti-GAMT antibody. See Fig. 1 legend for symbols.

과 PCr이 존재하며 (Lee *et al.*, 1988) 이들은 수정시 정자세포와 접촉하게 된다. 그러므로 Cr은 정자의 생성과 성숙, 생리에 어떤 역할을 수행하고 있을 가능성이 있다. 부정소에서 합성된 Cr이 상피세포에서 단지 자체적으로 사용되거나 상피세포의 기저부를 통하여 관강이 아닌 간질조직으로 분비될 가능성도 있으나 부정소에 존재하는 GAMT의 농도는 체내에서 가장 높은 수준이라는 점과 (Lee *et al.*, 1994) GAMT가 관강 쪽에 가까운 미세용모에 집중되어 있다는 점을 고려하면 그 가능성은 낮아 보인다.

미세용모의 발달정도와 GAMT 염색의 정도와는 비례적인 상관관계가 있었다. 즉 가장 미세용모가 발달되어 있는 부정소 두부의 근위부분에서 anti-GAMT 항체는 가장 강한 염색반응을 보였고, 그 반응정도는 미세용모가 점점 작아지는 두부 원위와 미부 쪽으로 갈수록 약화되었다. 이러한 부정소 부위에 따른 GAMT 발현의 차이는 이전의 Northern과 Western 분석, 형광면역조직학적 분석에 의한 결과, 부정소에 존재하는 GAMT mRNA와 단백질의 대부분이 미부보다는 두부에 집중적으로 발현된다는 사실과 완벽히 일치되는 결과이다 (Lee *et al.*, 1994). 그러나 이러한 상관관계가, 미세용모 내의 GAMT 농도에는 차이가 없지만 단순히 미세용모의 길이가 부정소 부위 별로 다르기 때문인지, 혹은 미세용모내 GAMT 농도가 부정소의 부위별로 차이가 있기 때문인지는 확실하지가 않다. 왜 GAMT가 두부에 집중적으로 발현되는지도 알려져 있지 않지만 부정소 두부는 주로 정자성숙에, 그리고 미부는 정자의 저장에 주요한 역할을 하고 있다는 사실을 고려한다면 (Amann *et al.*, 1993), Cr 합성이 정자의 성숙과정에 어떠한 역할을 하는 것으로 추측할 수 있을 것이나 현재로서는 이에 관한 어떠한 증거도 없다.

Cr과 PCr은 척추동물의 세포 에너지대사에서 중요한 역할을 하는 화합물로서 고에너지 인산화합물의 저장, 완충역할을 하는 것으로 인식되어 있다 (Watts, 1973; Walker, 1979). 따라서 Cr과 PCr은 특히 세포 내 에너지 요구량의 변동이 심한 세포, 즉 근육과 신경세포 등

에 많이 존재하고 있다. 예를 들어 마우스의 골격근에는 약 23.2 $\mu\text{mol/g}$ wet wt. 수준의 Cr과 약 17.2 $\mu\text{mol/g}$ 수준의 PCr이 존재하며 뇌조직에는 약 8.5 $\mu\text{mol/g}$ 의 Cr과 약 3.5 $\mu\text{mol/g}$ 의 PCr이 존재한다 (Beis & Newsholme, 1975; Ennor & Morrison, 1958; Marescau *et al.*, 1992). 그러나 최근에 Cr은 단순히 ATP의 저장고 역할을 할 뿐 아니라 여러 종류의 세포에서 ATP를 그 생산장소인 미토콘드리아에서 사용장으로 운반하는 전달체계로서 작동하는 것으로 확인되었다 (Wallimann & Hemmer, 1994). 그러므로 미토콘드리아에서 합성된 ATP는 그 자체로서 ATP가 사용되는 곳으로 이동하는 것이 아니라 일단 미토콘드리아에 존재하는 CK에 의하여 PCr로 전환이 되고 이 PCr이 세포질의 ATP가 필요한 곳으로 확산되어 세포질의 CK에 의하여 다시 ATP로 전환되어 사용된다. 이러한 Cr/PCr/CK system의 에너지 운반자로서의 역할을 "PCr shuttle system"이라고 하며 이러한 체계는 특히 근육세포와 같이 단백질의 치밀한 구조로 세포질이 채워져 있는 상황에서 더욱 필요하게 된다. 이것은 PCr이 ATP보다 분자량이 작으며 더 높은 확산계수를 가지고 있음으로 세포 내 에너지운반에 있어 ATP보다 유리한 위치에 있기 때문이다. 이 PCr shuttle system이 실제로 동물세포 내에서 작동하고 있다는 예는 성체의 정자세포를 이용한 Tombes와 Shapiro (1985)의 실험에서 최초로 증명되었다. 즉 SH기 억제제인 2,4-dinitrofluorobenzene (DNB)를 정자의 CK를 선택적으로 억제하는 낮은 농도로 (10~20 μM) 포함시켰을 때, 정자 꼬리의 파동운동 각도가 말단으로 갈수록 점점 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 양상은 정자 두부에서 생산된 ATP가 그 운반체계의 결함으로 인하여 전달이 방해될 때 가장 영향을 심하게 받는 부분이 말단부위일 것이라는 예측과 일치한다 (Tombes & Shapiro, 1985; Tombes *et al.*, 1987). 따라서 이러한 *in vivo*에서의 실험은 creatine-phosphocreatine-creatine kinase system이 세포 내에서 energy shuttle system으로서 작동한다는 실제적인 예를 보여 준

것이다.

그러므로 성계의 정자에서는 Cr /PCr /CK system 이 에너지 전달역할을 하는 “phosphocreatine shuttle”로서 정자의 운동성에 결정적 역할을 하고 있지만 이러한 에너지 운반체계가 포유류에서도 작용하고 있는지는 증명되어 있지 않다. 그 이유는 포유류의 정자에는 CK 활성이 없거나 성계에서 발견되는 CK보다 훨씬 적은 양의 CK 만이 존재하기 때문이다 (Tombes *et al.*, 1986). 그러나 사람과 가금의 정자세포에서 CK의 활성이 보고되어 있고 (Kaldis *et al.*, 1996; Lalwani *et al.*, 1996) 사람 CK의 isozyme 형태와 그 활성도는 정자의 수정능력과 밀접한 관계가 있다는 보고가 있었다 (Huszar *et al.*, 1988, 1992). 또한 *in vitro*에서 PCr을 사람 정자 배양액에 더하였을 때 정자의 운동성을 증진시켰다는 보고도 있다 (Fakih *et al.*, 1986). 이러한 사실들은 웅성생식수관에 존재하는 Cr 혹은 PCr이 정자 세포의 생리에 중요한 역할을 하고 있을 가능성을 시사하며, 그러므로 Cr /PCr이 웅성생식기능에서 차지하는 역할을 규명하기 위한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

Guanidinoacetate *N*-methyltransferase (GAMT) 는 creatine 생합성의 마지막 단계를 촉매하는 효소이며 이 효소반응에 의하여 합성되는 creatine은 세포 에너지대사에 있어 중요한 역할을 수행하고 있다. GAMT는 주로 간, 신장 그리고 정소와 부정소에 존재한다. 본 연구는 마우스 부정소에서 creatine이 합성되는 부위를 확인하기 위하여 anti-GAMT 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 그 결과 GAMT는 부정소 상피세포의 미세음모에서 강하게 발현되었으며 상피세포의 세포질에도 약하게 발현되고 있었다. 특히 미세음모가 발달한 부정소 두부의 근위부에서 발현정도가 가장 강하였고 미부 쪽으로 갈수록 점점 그 강도가 약하여졌다. 이러한 결과는 GAMT 혹은 creatine이 부

정소에서의 정자기능 혹은 성숙 과정에 관여하고 있을 수 있다는 가능성을 제시하여 준다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 anti-GAMT 항체를 공급하여 주신 일본 Toyama Medical and Pharmaceutical University의 Hirofumi Ogawa 박사에게 감사드립니다.

인용문헌

- Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DN (1993): The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reprod Fertil Dev* 5:361-381.
- Beis I, Newsholme A (1975): The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 152:23-32.
- Bodansky M (1935): The effect of thyroid and thyroxine on the concentration of creatine in the heart, muscle, liver, and testes of the albino rat. *J Biol Chem* 109:615-622.
- Ennor AH, Morrison JF (1958): Biochemistry of the phosphagens and related guanidines. *Physiol Rev* 38:631-674.
- Fakih H, MacLusky N, DeCherney A, Wallimann T, Huszar G (1986): Enhancement of human sperm motility and velocity *in vitro*: Effects of calcium and creatine phosphate. *Fertil Steril* 46:938-944.
- Huszar G, Vigue L, Corrales M (1988): Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic and oligospermic. *Biol Reprod* 38:1061-

1066.

- Huszar G, Vigue L, Morshedi M (1992): Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: A blinded study of 84 couples treated with *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 57:882-888.
- Kaldis P, Stolz M, Wyss M, Zanolla E, Rothen-Rutishauser B, Vorherr T, Wallimann T (1996): Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Cell Sci* 109:2079-2088.
- Lalwani S, Sayme N, Vigue L, Corrales M, Huszar G (1996): Biochemical markers of early and late spermatogenesis: Relationship between the lactate dehydrogenase-X and creatine kinase-M isoform concentrations in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 43:495-502.
- Lee H, Gong C, Wu S, Iyengar R (1991): Accumulation of phosphocreatine and creatine in the cells and fluid of mouse seminal vesicles is regulated by testosterone. *Biol Reprod* 44:540-545.
- Lee H, Ogawa H, Fujioka M, Gerton GL (1994): Guanidinoacetate methyltransferase in the mouse: Extensive expression in Sertoli cells of testis and in microvilli of caput epididymis. *Biol Reprod* 50:152-162.
- Lee HJ, Fillers WS, Iyengar MR (1988): Phosphocreatine, an intracellular high-energy compound, is found in the extracellular fluid of the seminal vesicles in mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7265-7269.
- Marescau B, De Deyn P, Wiechert P, Van Gorp L, Lowenthal A (1992): Comparative study of guanidino compounds in serum and brain of mouse, rat, rabbit, and man. *J Neurochem* 46:717-720.
- Navon G, Gogol E, Weissenberg R (1985): Phosphorus-31 and proton NMR analysis of reproductive organs of male rats. *Arch Androl* 15:153-157.
- Ogawa H, Date T, Gomi T, Konishe K, Pitot HC, Cantoni GL, Fujioka M (1988): Molecular cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for guanidinoacetate methyltransferase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:694-698.
- Reid BL, Cleland KW (1957): The structure and function of the epididymis: I. The histology of the rat epididymis. *Aust J Zool* 5:223-246.
- Sprando RL (1990): Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (eds.), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater, FL: Cache River Press, pp 277-280.
- Tombes RM, Shapiro BM (1985): Metabolite channeling: A phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell* 41:325-334.
- Tombes RM, Brokaw CP, Farr A, Shapiro BM (1986): A phosphorylcreatine shuttle for energy transport in sperm. *J Cell Biol* 103, No.5, Abstracts:276a.
- Tombes RM, Brokaw CJ, Shapiro BM (1987): Creatine kinase-dependent energy transport in sea urchin spermatozoa. *Biophys J* 52:75-86.
- Walker JB (1979): Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol* 50:177-242.
- Wallimann T, Hemmer W (1994): Creatine kinase

in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133/134:193-220.
Watts DC (1973): Creatine kinase (adenosine

5'-triphosphate-creatine phosphotransferase).
In: Boyer PD (ed.), *The Enzymes*, vol. 8. New York: Academic Press, pp 383-455.