

생쥐 난자의 제2극체 방출을 유발하는 정자 성분

김은희 · 오현주 · 손채은 · 이은주 · 김동신 · 여영근 · 박영식[†]
경북대학교 동물공학과

Sperm Component Inducing 2nd Polar Body Extrusion in Mouse Oocytes

E. H. Kim, H. J. Oh, C. E. Shon, E. J. Lee, D. S. Kim, Y. K. Yeo and Y. S. Park[†]

*Department of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University,
Daegu 702-701, Republic of Korea*

SUMMARY

This study was carried out to elucidate whether sperm contain a factor inducing second polar body extrusion and to search for an effective collection method of the sperm factor. Thus, sperm extract, dialyzed sperm-extract or liquid chromatographic fractions of sperm extract was microinjected into ovulated oocytes. And the microinjected oocytes were incubated for 24 hours to investigate about the extrusion of second polar body.

The results obtained were as follows;

1. Sperm extract significantly increased the second polar body extrusion.
2. Sperm extract showed five major fractions at retention volumes (RVs) 1.25, 1.37, 1.84, 2.10 and 2.67ml after separation with Superose 12 column. These sperm extract fractions did not significantly increase the second polar body extrusion.
3. Dialyzed sperm-extract significantly increased the second polar body extrusion.
4. Dialyzed sperm-extract showed three major fractions at RVs 1.88, 2.14 and 2.77ml after separation with Superose 12 column. Of these fractions, the fraction RV2.14 significantly increased the second polar body extrusion.

In conclusion, sperm extract contained a factor inducing the second polar body extrusion and the factor was contained largely in fraction RV2.14 after dialysis and liquid chromatographic fractionation of sperm extract.

(Key words : sperm extract, second polar body extrusion, liquid chromatography, dialysis)

서론

수정에 의한 난자의 활성화는 세포질내 Ca^{2+} 의 증감, 표층과립의 방출, 감수분열의 재개, 제2극체의

방출, 전핵의 형성, 세포분열 (Hewitson 등, 1998; Wang 등, 1998; Van der Bergh 등, 1995) 등 세포 현상을 동반한다.

이러한 난자의 활성화와 관련하여 인간정자를 생쥐 난자에 미세주입한 Rybouchkin 등(1995)은 정

본 연구는 경북대학교에서 지원하는 연구비(1998년)로 수행되었음.

[†]Correspondence

자 유래의 성분이 제2극체의 방출과 전핵의 형성을 유발한다고 보고하였다. 또한 많은 연구에서 정자는 수정시 난자의 세포질에서 일어나는 Ca^{2+} 의 증감을 유발하는 인자를 난자에 전달한다(Dozortser 등, 1995; Stice와 Robl, 1990; Dale 1983)고 하였으며, 또한 정자추출물을 미세주입하였을 때 난자 세포질내 Ca^{2+} 의 증감이 유발되었다(Homa 등, 1993; Swann, 1990; Swann 1994)고 보고된 바 있다. 미세주입에 이용되는 정자추출물은 주로 일정 크기의 공극을 가진 여과막을 이용 분리하거나 (Oda 등 1999, Wolny 등 1999, Wu 등 1998a, 1998b; Sticker 1997), 투석막을 이용 투석하여 (Sasagawa 등, 1997) 준비되었다.

한편 난자의 활성을 유발하는 정자성분을 동정하기 위한 연구에서 Swann(1990)은 정자성분이 100 KD이상의 단백질이라고 하였으며, Parrington 등(1996)은 33 KD subunit를 가진 oligomer로서 정자의 적도부에 존재한다고 하였다. 그러나 Wolny 등(1999)과 Parrington 등(1999)은 Parrington 등(1996)의 결과를 부정하였으며, Wu 등(1998a)은 29~68 KD의 분자량을 가진 물질일 것으로 추정된 바 있다. 한편 Stricker (1997)는 정자 유래의 난자활성유발물질이 세포질내 수용체와 결합하며 10 KD 이상의 분절에 함유되어 있다고 하였다.

이와 같이 난자 활성화를 유발하는 정자 성분은 연구자간에 많은 차이가 있으며 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 난자 활성화의 지표로서 제2극체의 방출을 유발하는 물질이 정자에 함유되어 있는지를 조사하고, 나아가서 이 물질을 효율적으로 분리 회수할 수 있는 방법을 찾기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 정자의 회수와 준비

정자를 회수하기 위하여, 8주령 이상의 수컷 생쥐로부터 정소상체 미부를 적출하여 실온에서 M_2 용액 (94.66 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.71 mM $CaCl_2 \cdot H_2O$, 1.19 mM KH_2PO_4 , 1.19 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.15 mM $NaHCO_3$, 20.85 mM HEPES, 23.28 mM Na-lactate, 0.33 mM Na-pyruvate, 5.56

mM glucose, 4 mg/ml BSA)으로 반복 세척하였다. 세척한 정소상체 미부로부터 회수한 정자를 $200 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 $37^\circ C$, 100% 습도, 5% CO_2 조건의 배양기에서 2 시간 이상 배양하였다.

2. 정자 추출물과 투석한 정자 추출물의 준비

정자로부터 수용성 단백질을 추출하기 위하여, 배양한 회석정액을 $200 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 정자 펠렛을 M_2 용액으로 다시 회석하여 정자를 부유하고 동일한 방법으로 원심분리하였다. 원심분리후 상등액을 제거한 다음 정자 펠렛을 정자추출용액 SES (120 mM KCl, 12.695 mM K_2HPO_4 , 7.305 mM KH_2PO_4 , 1 mM benzamidin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2.5 mM EDTA-2Na)로 부유한 다음 동일한 방법으로 원심분리하여 정자를 세척하였다. 상등액을 제거한 후 정자 펠렛에 SES를 첨가하고 부유한 다음 $4^\circ C$ 에서 $1,500 \times g$ 로 10분간 원심분리하였다. 정자 펠렛을 SES로 재부유한 다음 초음파 발생장치 (Ultrasonic Liquid Processor VC 502, Sonic & Material Inc., USA)를 이용 20A에서 5초간 6회 초음파를 처리하여 정자 막의 파열을 유도하였다. 이때 실험에 사용된 정자의 수는 1.5×10^6 였다. 초음파 처리 후 $4^\circ C$ 에서 $10,000 \times g$ 로 30분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 $0.2 \mu m$ 공극을 이용하여 여과하여 정자 추출물을 준비하였다. 한편 정자추출물을 투석막 (Sigma Co., USA)을 이용 $4^\circ C$ 에서 12시간 이상 투석한 후 $0.2 \mu m$ 공극을 이용 여과하여 투석한 정자 추출물을 준비하였다.

3. 액체크로마토그래피를 이용한 추출물의 분리

정자추출물 또는 투석정자추출물을 동결건조한 다음 미세주입용액 MS(20 mM HEPES, 120 mM KCl, pH 7.0)으로 용해하였다. 용해한 정자추출물을 Superose 12 column이 장착된 액체크로마토그래피(LC)인 Smart system (Pharmacia Co., Sweden)에 주입한 다음 20 mM HEPES가 함유된 120 mM KCl용액 (pH 7.0)을 $80 \mu l/min$ 속도로 관류하여 추출물에 함유되어 있는 성분을 분리하였으며, 분리 성분은 280 nm의 파장을 이용 검색하였다. 자동으

로 회수된 분절은 실험에 공시할 때까지 -20°C 에서 보존되었다.

4. 미세주입용 난자의 회수

정자추출물 또는 LC 분리성분을 주입할 난자를 회수하기 위하여, 3~4주령의 암컷 생쥐의 복강에 7.5 IU의 임마철청성 성선자극호르몬(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG)을 주사한 후 48시간에 임부용모막성 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin, HCG)을 주사하여 과배란을 유도하였다. HCG주사 후 13시간 30분 경에 경추탈골법으로 도살한 생쥐의 복부를 개열하고 난소와 난관을 적출한 다음 M_2 용액으로 반복 세척하였다. 세척한 난관의 팽대부를 파열시켜 난자를 회수하였으며, 회수한 난자를 M_2 용액에서 반복 세척한 다음 0.1% hyaluronidase 용액에서 3~5분간 배양하여 난구세포를 제거하였다. 나화된 난자를 M_2 용액으로 반복 세척하여 미세주입할 때까지 난막의 유동성을 높이기 위하여 39°C 에서 배양하였다.

5. 미세주입과 난자활성의 평가

정자추출물 또는 LC 분리성분이 난자의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 난구세포가 제거된 나화 난자를 파라핀오일로 피복시킨 $10\mu\text{l}$ 의 M_2 소적에 옮기고 보정용 피펫으로 보정하였다. 준비된 정자추출물 또는 LC 분리성분을 MS로 희석한 다음 주입용 피펫에 흡인하여 보정된 난자의 세포질에 미세주입하였다. 미세주입한 난자를 M_2 용액으로 반복 세척한 후 $25\mu\text{l}$ 의 M_{16} (94.66 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.71 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.19 mM KH_2PO_4 , 1.19 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 23.28 mM Na-lactate, 0.33 mM Na-pyruvate, 5.56 mM glucose, 4mg/ml BSA) 소적에 옮겨 37°C , 5% CO_2 , 100% 습도 조건 하에서 24시간 배양하였으며, 배양시간별로 난자의 제2극체의 방출 여부를 조사하였다.

6. 실험설계

1) 실험 1

정자추출물의 효과를 조사하기 위하여 미세주

입을 하지 않은 난자(Control 1), 미세피펫으로 주입자극만을 준 난자(Control 2), 및 정자추출용액을 미세주입한 난자(Control 3)를 정자추출물을 주입한 난자(SE)와 동일한 방법으로 배양하여 제2극체 형성율을 조사하였다.

2) 실험 2

정자추출물을 LC로 분리하였으며, 분리 성분인 RV1.25, RV1.37, RV1.84, RV2.10, 및 RV2.17을 함유한 용액을 미세주입한 난자를 배양하여 제2극체의 형성율을 조사하였다.

3) 실험 3

투석정자추출물의 효과를 비교하기 위하여 정자추출용액을 미세주입한 난자(Control 1)와 미세주입용액을 미세주입한 난자(Control 2)를 투석한 정자추출물을 주입한 난자와 동일한 방법으로 배양하여 제2극체 형성율을 조사하였다.

4) 실험 4

투석정자추출물을 LC로 분리하였으며, 분리 성분인 RV1.88, RV2.14, 및 RV2.77을 함유한 용액을 미세주입한 난자를 배양하였다. 투석한 정자추출물의 분리성분의 효과를 비교하기 위하여 정자추출용액을 미세주입한 난자(Control)를 동일한 방법으로 배양하여 제2극체 형성율을 조사하였다.

7. 통계분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균과 오차 (Mean \pm SE)를 구하였으며 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan 다중검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 정자추출물이 미세주입된 난자의 제2극체 방출에 미치는 영향

정자추출물이 난자의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 정자추출물을 난자에 미세주입한 다음 0, 3, 6 및 24시간 배양한 난자로부터 제2극체의 방출을 조사하였던 바 결과는 Fig. 1과 같다.

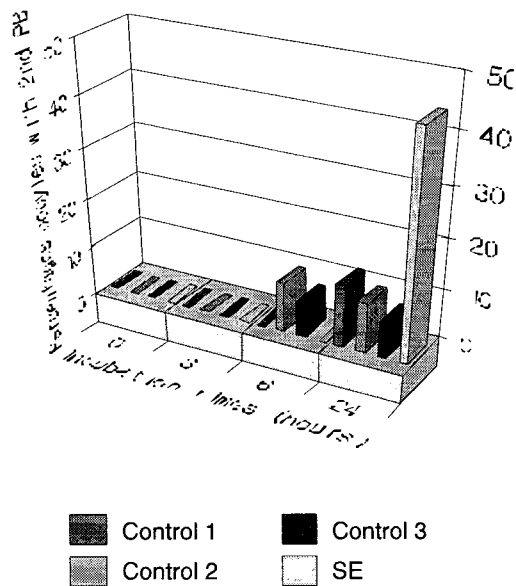


Fig. 1. Effect of sperm extract on second polar body extrusion of mouse oocytes. Control 1 means that 14 oocytes were incubated without microinjection. Control 2 means that 8 oocytes were incubated after microinjection with only micropipet. Control 3 means that 10 oocytes were incubated after microinjection with sperm extraction solution (SES). SE means that 9 oocytes were incubated after microinjection with sperm extract. Respective percentages of oocytes with 2nd polar body were 7.1, 10.0, 12.5 and 50.0% in Control 1, Control 2, Control 3, and SE after incubation for 24 hours.

난자를 배양하기전 제2극체의 방출율은 미세주입의 자극이 없었던 대조구 1(Control 1), 미세주입 자극만을 준 대조구 2(Control 2), 정자추출용액을 미세주입한 대조구 3(Control 3), 및 정자추출물을 미세주입한 처리구(SE)에서 각각 0, 0, 0 및 0%였다. 배양 3시간에 제2극체 방출율은 대조구 1, 대조구 2, 대조구 3 및 처리구에서 각각 0, 0, 0 및 0%였다. 배양 6시간에서는 각각 7.1, 10.0, 12.5 및 12.5%였으며, 배양 24시간에 각각 7.1, 10.0, 12.5 및 50.0%였다.

Wu 등 (1998b)은 미세주입하지 않은 난자의 제2극체 방출율이 2.8%였으나 돼지 정자추출물을 미

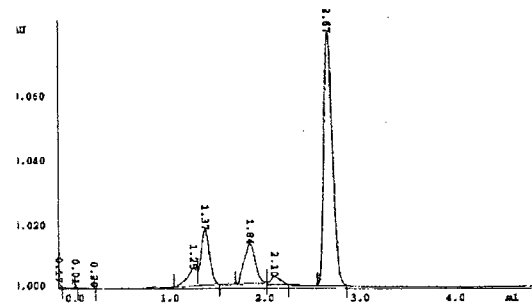


Fig. 2. Fractions of sperm extract. Sperm extract was separated through Superose 12 column with eluent I (120mM KCl buffered with 20mM NaH_2PO_4 , pH 7.0) at flow rate of $80 \mu\text{l}/\text{min}$. Using the wavelength of 280nm, five major fractions were detected at retention volumes of 1.25, 1.37, 1.84, 2.10 and 2.67ml.

세주입한 난자의 제2극체의 방출율이 95.5%로 증가하였다고 보고하였다. Sasagawa와 Yanagimachi (1996)도 햄스터 정자추출물을 미세주입한 난자에서 84.9%의 제2극체 방출율을 얻었고, Stricker (1997)도 nemertean worm *Cerebratulus lacteus* 난자에 동종의 정자추출물을 주입하여 99%의 제2극체 방출율을 얻었다고 보고한 바 있다.

따라서 본 실험 방법으로 회수한 정자의 추출물에는 생쥐난자에서 제2극체를 방출을 유발하는 성분이 함유되어 있을 것으로 사료된다.

2. 액체크로마토그래피에 의해 분리된 정자추출물의 분질이 난자의 제2극체 방출에 미치는 영향 정자추출물을 20 mM HEPES로 완충된 120 mM KCl (pH 7.0) 용액으로 용해시킨 다음 Superose 12 column이 장착된 LC에서 주입한 후 20 mM NaH_2PO_4 가 함유된 120 mM KCl 관류액(pH 7.0)을 $80 \mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 관류하여 성분을 분리하였으며 결과는 Fig. 2와 같다. 정자추출물에는 retention volume (RV) 1.25, 1.37, 1.84, 2.10 및 2.67 ml에서 다섯 개의 주요 peaks를 보이는 분질들이 함유되어 있었다.

정자추출물로부터 분리한 분질이 난자활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RV 1.25, 1.37, 1.84, 2.10 및 2.67 분질을 난자에 미세주입한 다음

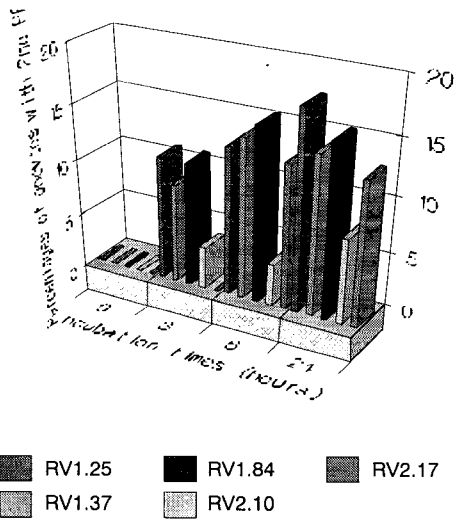


Fig. 3. Effect of liquid chromatographic fractions of sperm extract on second polar body extrusion. RV1.25 means that 45 oocytes were incubated after microinjection with RV1.25 fraction as shown at Fig 2. RV1.37 means that 56 oocytes were incubated after microinjection with RV1.37 fraction. RV1.84 means that 45 oocytes were incubated after microinjection with RV1.84 fraction. RV2.10 means that 26 oocytes were incubated after microinjection with RV2.10 fraction. RV2.17 means that 23 oocytes were incubated after microinjection with RV2.17 fraction. Respective percentages of oocytes with second polar body were 22.2, 20.0, 15.9, 8.0, and 17.4% in RV1.25, RV1.37, RV1.84, RV2.10, and RV2.17 after incubation for 24 hours.

0, 3, 6 및 24시간 배양한 난자에서 제2극체의 방출을 조사하였던 바 결과는 Fig. 3과 같다.

난자를 배양하기전 제2극체 방출율은 RV1.25, RV1.37, RV1.84, RV2.10 및 RV2.67에서 각각 0, 0, 0, 0 및 0%였다. 난자 배양 3시간에 제2극체 방출율은 RV1.25, RV1.37, RV1.84, RV2.10 및 RV2.67 처리구에서 각각 11.1, 10.0, 11.4, 4.0 및 0.0%였고, 배양 6시간에서는 각각 15.6, 14.0, 15.9, 4.0 및 13.0%였으며, 배양 24시간에는 각각 22.2, 20.0, 15.9, 8.0 및 17.4%였다.

배양시간별 제2극체의 방출율은 처리구간에 뚜렷한 차이가 없었으며, 정자추출물에서 나타난 제2극체 방출 효과(Fig. 1)를 보이는 분절이 없었다. 이는 정자추출물을 LC로 분리하는 동안 제2극체의 방출을 자극하는 인자가 감소되었거나 불활성화 되었을 것으로 추론된다.

3. 투석한 정자추출물이 미세주입된 난자의 제2극체의 방출에 미치는 영향

투석한 정자추출물이 난자의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 투석한 정자추출물을 난자에 미세주입한 다음 0, 3, 6 및 24시간 배양한 난자로부터 제2극체의 방출을 조사하였던 바 결과는 Fig. 4와 같다.

난자를 배양하기전 제2극체 방출율은 정자성분

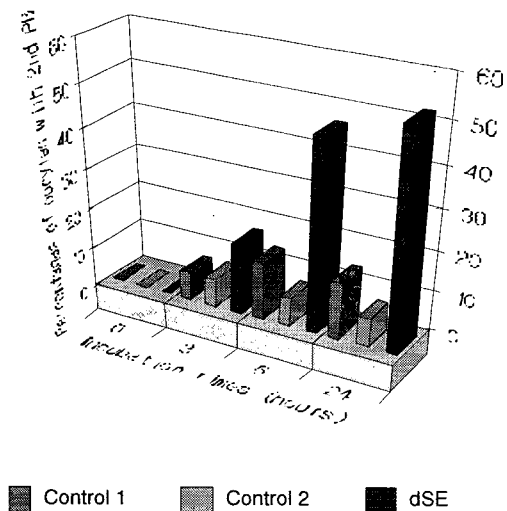


Fig. 4. Effect of dialyzed sperm extract on second polar body extrusion. Control 1 means that 14 oocytes were incubated with microinjection with sperm extraction solution(SES). Control 2 means that 14 oocytes were incubated after microinjection with microinjection solution. dSE means that 17 oocytes were incubated after microinjection with dialyzed sperm extract. Respective percentages of oocytes with second polar body were 13.3(±13.3), 4.8(±4.8) and 54.3(±5.7)% in Control 1, Control 2, and dSE after incubation for 24 hours.

추출시 사용한 SES를 미세주입한 대조구 1(Control I), 미세주입용 용액 MS만을 주입한 대조구 2(Control II) 및 투석한 정자추출물을 미세 주입한 처리구(SE)에서 각각 0, 0 및 0%였다. 배양 3시간에 제2극체 방출율은 대조구1, 대조구2 및 처리구에서 각각 6.7 ± 6.7 , 4.8 ± 4.8 및 $18.1 \pm 11.7\%$ 로 처리구에서 높았으나 유의한 차이는 없었다. 배양 6시간에서는 각각 13.3 ± 13.3 , 4.8 ± 4.8 및 $47.6 \pm 6.2\%$ 로 처리구가 대조구 2보다 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), 남자 배양 24시간에서는 각각 13.3 ± 13.3 , 4.8 ± 4.8 및 $54.3 \pm 5.7\%$ 로 처리구의 제2극체 방출율이 유의하게 높았다($p < 0.01$).

정자내 수용성 물질을 추출하는데 사용된 SES 또는 정자추출물을 주입할 때 함께 주입되는 MS는 제2극체의 방출을 유의하게 자극하지 않았으며, 이는 미세주입용 용액만을 난자에 주입한 많은 연구에서 난자활성화와 관련된 남자 세포질내 Ca^{2+} 의 증가가 없었다는 보고 (Homa 등, 1993; Stricker, 1997; Swann, 1992, 1994; Wolny 등, 1999; Wu 등, 1998b)와 일치하였다. 따라서 투석한 정자추출물은 미세주입한 난자에서 제2극체의 방출을 유의하게 자극하는 것으로 사료된다.

한편 Sasagawa 등(1997)은 원형정자를 생쥐난자에 주입하였을 때 92%가 MII단계에서 머물러 있었으나, 투석하여 회수한 정자성분과 같이 주입하였을 때 모든 난자에서 제2극체와 전핵이 형성되었으며, 또한 정자를 직접 주입하였을 때 95.8%에서 제2극체와 전핵이 형성되었다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험에서도 정자추출물을 투석하였을 때 제2극체의 방출을 자극하는 성분은 제거되지 않는 것으로 사료된다.

정자추출물을 난자에 미세주입한 후 배양시간이 증가함에 따라 제2극체의 방출율이 증가하였는데, 특히 배양 6시간까지 급속히 증가하였으며 이후 24시간까지 느린 증가를 보였다. Nagy 등(1994)은 남자 세포질내 정자를 미세주입 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)한 후 2, 4 및 6시간 배양하여 각각 52, 68 및 80%의 제2극체 방출율을 보고한 바 있다. 이러한 결과로부터 미세주입에 의한 난자활성 자극 후 6시간까지 제2극체가 급속히 방출되는 것으로 추론된다.

4. 액체크로마토그래피에 의해 분리된 투석정자추출물의 분절이 난자의 제2극체 방출에 미치는 영향

투석한 정자추출물 중에서 난자의 활성을 자극하는 성분을 분리하기 위하여 동결 건조한 정자추출물을 20mM HEPES로 완충된 120mM KCl (pH 7.0) 용액으로 용해시킨 다음 Superose 12 column이 장착된 LC에서 주입한 후 20mM HEPES가 함유된 120mM KCl 관류액을 $80 \mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 관류하여 성분을 분리하였으며 결과는 Fig. 5와 같다. 정자추출물에는 RV 1.88, 2.14 및 2.77ml에서 peaks를 보이는 분절들이 함유되어 있었다.

투석한 정자추출물에서는 Fig. 2에서 보여준 다섯 개의 주요 peaks 중에서 1.25와 1.37에 해당하는 peaks가 나타나지 않았으며, RV2.14분절은 RV1.88과 2.77분절의 감소에 비해하지 않게 많이 나타났다. 따라서 RV2.14분절을 구성하는 성분은 투석에 의해서도 제거되지 않는 화학적 성질을 가지고 있는 것으로 추론된다.

투석한 정자추출물로부터 분리한 분절이 난자의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, RV 1.88, 2.14 및 2.77분절을 난자에 미세주입한 다음 0, 3, 6 및 24시간 배양한 난자로부터 제2극체의 방출을 조사하였던 바 결과는 Fig. 6과 같다.

난자를 배양하기 전 제2극체 방출율은 미세주입

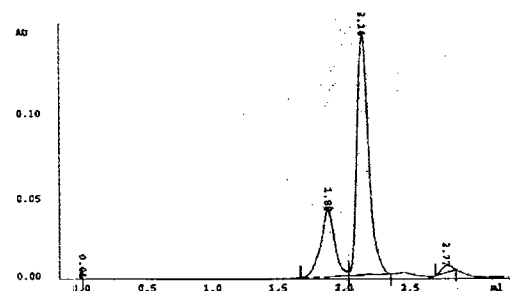


Fig. 5. Fractions of dialyzed sperm-extract. Dialysed sperm extract was separated with Superose 12 column with eluent 2 (120mM KCl buffered with 20mM HEPES, pH 7.0) at flow rate of $80 \mu\text{l}/\text{min}$. Using the wavelength of 280nm, three major fractions were detected at retention volumes of 1.88, 2.14 and 2.77ml.

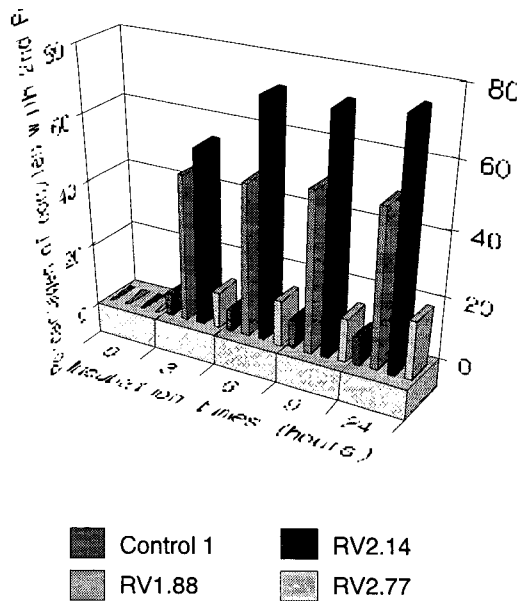


Fig. 6. Effect of chromatographic fractions of dialyzed sperm extract on second polar body extrusion. Control means that 45 oocytes were incubated after microinjection with sperm extraction solution (SES). RV1.88 means that 46 oocytes were incubated after microinjection with RV1.88 fraction. RV2.14 means that 44 oocytes were incubated after microinjection with RV2.14 fraction. RV2.77 means that 43 oocytes were incubated after microinjection with RV2.77 fraction. Respective percentages of oocytes with 2nd polar body were 9.1 (± 2.4), 51.1 (± 3.9), 75.9 (± 3.2) and 15.2 (± 4.4) % in Control, RV1.88, RV2.14 and RV2.77 after incubation for 24 hours.

없이 배양한 대조구(Control), LC 분리 분절 RV 1.88, 2.14 및 2.77을 각각 미세주입한 처리구에서 각각 0, 0, 0 및 0%였다.

배양 3시간에 제2극체 방출율은 대조구, RV 1.88, 2.14 및 2.77 처리구에서 각각 7.1 ± 3.0 , 45.7 ± 1.7 , 54.6 ± 6.1 및 $8.0 \pm 3.3\%$ 로 RV 1.88과 RV 2.14 처리구에서 유의하게 높았으며 ($p < 0.01$), 난자 배양 6시간에 각각 7.1 ± 3.0 , 48.6 ± 2.7 , 73.0 ± 2.1 및 $8.0 \pm 3.3\%$ 로 RV 1.88과 RV 2.14 처리구가 대조구와 RV 2.77 처리구보다 높았고, RV 2.14 처리구가 RV 1.88 처리구보다 유의하게 높았다 ($p < 0.01$). 난자 배양 9시간에 제2극체 방출율은 대조구, RV 1.88, 2.14 및 2.77 처리구에서 각각 $9.1 \pm$

2.4 , 48.6 ± 2.7 , 73.0 ± 2.1 및 $10.2 \pm 4.4\%$ 로 RV 1.88과 RV 2.14 처리구가 대조구와 RV 2.77 처리구보다 유의하게 높았고 ($p < 0.01$), RV 2.14 처리구가 RV 1.88 처리구보다 유의하게 높았다 ($p < 0.01$). 난자 배양 24시간에 제2극체 방출율은 대조구, RV 1.88, 2.14 및 2.77 처리구에서 각각 9.1 ± 2.4 , 51.1 ± 3.9 , 75.9 ± 3.2 및 $15.2 \pm 4.4\%$ 로 RV 1.88과 RV 2.14 처리구가 대조구와 RV 2.77 처리구보다 유의하게 높았고 ($p < 0.01$), RV 2.14 처리구가 RV 1.88 처리구보다 유의하게 높았다 ($p < 0.01$).

즉, 투석한 정자추출물을 LC로 분리하여 회수한 분절 RV2.14와 RV1.88에는 난자를 활성화시키는 인자가 함유되어 있는 것으로 사료된다. 특히 제2극체 방출율이 유의하게 높은 RV2.14 분절을 미세주입한 난자에서 3시간 이후 급속히 증가하여 6시간까지 정점에 이르렀는데, Kimura와 Yanagimachi (1995)도 ICSI한 후 5~7시간에 난자의 94%에서 제2극체 방출을 보고한 바 있다.

따라서 투석한 정자추출물에서 분리한 RV2.14 분절에는 난자로부터 제2극체를 방출하는데 관여하는 성분이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 난자를 활성화시키는 물질이 정자에 함유되어 있는지를 밝히고 이 물질을 효율적으로 회수할 수 있는 방법을 찾기 위하여, 정자추출물을 직접 또는 투석하여 미세주입하거나 이들을 액체크로마토그래피(LC)로 분리하여 회수한 분절을 미세주입하여 24시간 배양하면서 제2극체의 방출을 조사하였던 바, 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 정자추출물은 제2극체의 방출을 유의하게 증가시켰다.
2. 정자추출물에는 Superose 12 column으로 분리하였을 때 retention volumes (RVs) 1.25, 1.37, 1.84, 2.10 및 2.67ml 위치에서 5개의 주요 분절이 얻어졌다.
3. 정자추출물을 분리하여 회수한 성분은 제2극체의 방출을 유의하게 증가시키지 않았다.

4. 투석한 정자추출물은 제2극체의 방출을 유의하게 증가시켰다.
 5. 투석정자추출물을 Superose 12 column을 분리하였을 때 RVs 1.88, 2.14 및 2.77ml에서 3개의 주요 분절이 얻어졌다.
 6. 투석정자추출물의 분절 중에서 RV2.14분절이 제2극체 방출을 유의하게 증가시켰다.
- 결론적으로, 정자추출물에는 제2극체의 방출을 유발하는 인자가 함유되어 있으며, 이 인자는 정자추출물을 투석한 다음 LC로 분리한 분절 중에서 RV2.14분절에 주로 함유되어 있다.

참고문헌

- Dale B, De Felice LJ, and Ehrenstein G. 1985. Injection of a soluble sperm extract into sea urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia*, 41:1068-1070.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, and Dhont M. 1995. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: The role of the sperm cell. *Hum. Reprod.*, 10:403-307.
- Hewitson LD, Takahashi D, Dominko T, Simerly C, and Schatten G. 1998. Fertilization and embryo development to blastocysts after intracytoplasmic sperm injection in the rhesus monkey. *Hum. Reprod.*, 13:3449-55.
- Homa ST, Carrol J, and Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum. Reprod.*, 8:1274-1281.
- Kimura Y and Yanagimachi R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52:709-20.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, and Van Steirteghem A. 1994. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 9:1743-1748.
- Oda S, Deguchi R, Mohri T, Shikano T, Nakanishi S, and Miyazaki S. 1999. Spatiotemporal dynamics of the Ca^{2+} rise induced by micro-injection of sperm extract into mouse eggs: Preferential induction of a Ca^{2+} wave from from the cortex mediated by the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Devel. Biol.*, 209:172-185.
- Parrington J, Johns KT, Lai A, and Swann K. 1999. The soluble sperm factor that causes Ca^{2+} release from sea-urchin(*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca^{2+} oscillations after injection into mouse eggs. *Biochem. J.*, 341:1-4.
- Parrington J, Swann K, Schevchenko VL, Sesay AK, and Lai FA. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 379: 364-368.
- Rybouchkin A, Dozortsev D, De Sutter P, Qian C, and Dhont M. 1995. Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 10:1130-1135.
- Sasagawa I and Yanagimachi. 1996. Comparison of methods for activating mouse oocytes for spermatid nucleus transfer. *Zygote*, 4:269-274.
- Sasagawa I, Tomaru M, Adachi Y, Kubota Y, and Nakada T. 1997. Simultaneous injection of round spermatid nuclei from mice and hamster oosinogen can initiate the normal development of mouse embryos. *J. Urol.*, 158:2006-2008.
- Stice SL and Robl JM. 1990. Activation of mammalian oocytes by a factor from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:272-280.
- Sticker SA. 1997. Intracellular injections of a soluble sperm factor trigger calcium oscillation and meiotic maturation in unfertilized oocytes of a marine worm. *Dev. Biol.*, 186:185-201.
- Swann K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 110:1295-1302.
- Swann K. 1992. Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine

- sensitive store. *Biochem. J.*, 287:79-84.
- Swann K. 1994. Ca oscillations and sensitization of Ca release in unfertilized mouse egg injected with a sperm factor. *Cell Calcium*, 15:331-339.
- Van der Bergh M, Bertrand E, and Englert Y. 1995. Second polar body extrusion is highly predictive for oocyte fertilization as soon as 3hr after intracytoplasmic sperm injection. *J. Assit. Reprod. Genet.*, 12:258-262.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, and Day BN. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatazoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Mol. Reprod. Dev.*, 518:346-353.
- Wolny YM, Fissore RA, Wu H, Reis MM, Colombero CT, Ergun B, Rosenwaks Z, and Palermo GD. 1999. Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca^{++} release in mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 52:277-287.
- Wu H, He CL, and Fissore RA. 1998b. Injection of a porcine sperm factor induces activation of mouse eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:37-47.
- Wu H, He CL, Jehn B, Black SJ, and Fissore RA. 1998a. Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev. Biol.*, 203:369-381.
-

(접수일: 2000. 11. 13 / 채택일: 2000. 12. 10)