

희석액의 삼투질농도에 따른 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 운동성 변화

임한규 · 장영진* · 장윤정*

국립수산진흥원 울진수산종묘시험장
*부경대학교 수산과학대학 양식학과

Changes of Sperm Motility in Black Seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) by Osmolality of Diluents

Han Kyu Lim, Young Jin Chang* and Yun Jeong Chang*

Uljin Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Uljin-gun 767-860, Korea
*Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

The effects of osmolality on the sperm motility in black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) were studied. Sperm motility of black seabream was suppressed when the osmolality was equal to the seminal fluid. But sperm became motile when the osmolality increased in electrolyte solution (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) and non-electrolyte solution (mannitol, glucose, fructose, sucrose). The changes of sperm motility index (SMI) by osmolality of diluents described a parabola. In all of the diluents, SMI was the highest at ca. 1,000 mOsm/kg, which is similar to the osmolality of seawater. Sperm motility was induced by osmolality of diluents, but exposure to hypotonic or hypertonic diluents was harmful to the sperm.

Key words: Black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*, Sperm motility, Osmolality

서 론

체의 수정을 하는 경골어류의 정자는 정소내에서 운동이 억제되어 있다가 방정이 이루어지면서 환경수중의 삼투질농도, 이온농도, pH 등의 물리·화학적 요인의 변화에 의해 운동성을 획득한다(Morisawa and Suzuki, 1980; Morisawa and Okuno, 1982; Morisawa, 1994). 운동성을 획득한 정자는 알과 만나기 위하여 활발히 움직이는 과정에서 운동활성이 점차 감소되어 불과 수분 후에는 운동을 멈추게 된다(Billard and Cosson, 1992). 연어과 어류에 있어서 정자의 운동은 세포 외부에 존재하는 Ca²⁺의 세포내 유입으로 축적된 cAMP에 의해서 개시되는 것으로 밝혀졌다(Morisawa, 1985). 이와 같이 어류 정자의 운동기구가 어느 정도 해명되고는 있으나, 해수어류 정자의 운동 개시 및 억제기구에 관한 연구결과는 거의 찾아볼 수 없

는 실정이다. 특히 담수 보다 월등히 높은 삼투질농도를 가진 해수는 정자의 운동개시에 있어서도 담수어류와 많은 차이를 보이고 있다(Takai and Morisawa, 1995). Morisawa (1994)는 해수어류 정자가 환경수의 높은 삼투질농도에 의해 운동성을 획득하고 외부 삼투질농도의 증가에 따른 세포내 K⁺ 농도의 상승에 의해 운동성이 조절된다고 제안한 바 있지만, 아직 이를 뒷받침할 수 있는 실험적 자료는 부족하다.

본 연구에서는 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 운동 특성을 파악하기 위하여 각각 다른 삼투질농도의 희석액에서 정자의 운동성을 조사하여 외부 삼투질농도가 정자의 운동에 미치는 영향을 알아보았다. 감성돔 정자에 적합한 삼투질농도의 구명은 정자의 운동성을 높게 유지시켜주는 수정액의 제조나 정자의 냉장·냉동 보존에 필요한 희석액의 선정에 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

진해질 희석액의 삼투질농도에 따른 정자의 운동성을 평가하기 위하여 75~900 mM 농도의 NaCl, KCl, CaCl₂ 및 MgCl₂ 용액을 만들었고, 비진해질 희석액의 농도에 따른 정자의 운동성을 조사하기 위하여 300~1,800 mM의 mannitol, glucose, fructose 및 sucrose 용액을 제조하였다. 정자의 운동성은 정액과 희석액을 1:10의 비율로 희석한 후 30초 이내에 평가하였다. 운동성은 각각 다른 개체의 정액을 사용하여 5회씩 반복 측정하였으며, 실험은 실온에서 이루어졌다.

삼투압 충격이 정자의 운동성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 채취된 정액을 해수어류용 생리식염수로 희석한 다음, 원심분리(3,000 rpm, 5 min.)하는 과정을 3회 반복하여 정장(seminal fluid)이 제거된 정자를 얻고 이를 실험에 사용하였다.

탈이온수와 NaCl을 이용하여 희석액의 농도를 저장(hypotonic)인 0 mM(탈이온수), 정장과 등장(isotonic)에 가까운 150 mM 및 고장(hypertonic)인 900 mM로 조절한 후, 여기에 정자를 각각 1, 2, 3, 4, 5분간 노출시켜 삼투압 충격을 주었다. 이후 NaCl 용액과 증류수를 첨가하여 희석액의 농도를 450 mM (900 mOsm/kg)로 조절하여 정자의 운동성을 파악하였다.

희석액의 삼투질농도에 따른 정자의 운동성을 평가하기 위하여, 각각의 실험에서 희석액과 정액을 정해진 비율대로 섞은 다음, 광학현미경으로 Strussmann et al. (1994)의 방법을 이용하여 정자운동지수(sperm motility index, SMI)를 구하였다.

결 과

NaCl의 농도별 실험에서 SMI는 NaCl 농도가 증가할수록 높아져 450 mM과 600 mM에서 4.8±0.5로 가장 높았으며, 그 이상으로 농도가 진해질수록 SMI는 낮아졌다. KCl의 경우도 NaCl과 같이 농도가 진해질수록 SMI가 상승하여 450 mM과 600 mM에서 5.0±0.0으로 가장 높았고, 그 이상의 농도부터 낮아져 900 mM에서는 2.2±0.5까지 감소하였다. CaCl₂와 MgCl₂에서도 NaCl이나 KCl과 같은 경향이었으며, 둘다 225 mM에서 각각 4.8±0.5, 3.6±0.6으로 SMI가 가장 높았다(Fig. 1).

NaCl, KCl, CaCl₂ 및 MgCl₂에서 각 용액의 농도(C)에

따른 SMI와의 관계를 곡선식으로 표시하면 다음과 같다. 각각 다른 농도를 가진 4가지 용액에서 삼투질농도에 따른 정자의 운동성 변화는 서로 비슷한 경향이였다. NaCl과 KCl에서 용액의 농도에 따른 SMI의 관계를 나타내는 곡선은 536 mM과 507 mM에서 최고값을 보였다.

$$\text{NaCl : SMI} = -0.000017C^2 + 0.018238C - 0.428571 \\ (r^2=0.9386)$$

$$\text{KCl : SMI} = -0.000020C^2 + 0.020286C - 0.285714 \\ (r^2=0.9525)$$

$$\text{CaCl}_2 : \text{SMI} = -0.000047C^2 + 0.029524C - 0.604762 \\ (r^2=0.8355)$$

$$\text{MgCl}_2 : \text{SMI} = -0.000048C^2 + 0.026952C - 0.280952 \\ (r^2=0.9382)$$

Mannitol 농도에 따른 정자의 운동성도 농도가 진해질수록 SMI가 높아져 900 mM과 1,200 mM에서 각각 4.8±0.5와 4.6±0.6이 되었으며 그 이상의 농도에서는 낮아졌다. Mannitol에서와 같이 glucose에서도 농도가 증가할수록 SMI가 높아져 900 mM에서 5.0±0.0으로 최고값을 나타냈으며, 600 mM과 1,200 mM에서도 4.4 이상으로 높게 유지되었다. Fructose의 경우도 600~1,200 mM에서 모든 정자가 SMI 5.0±0.0로 높은 운동활성을 보였고, sucrose에서도 다른 비진해질 용액과 같은 경향이였다(Fig. 2).

Mannitol, glucose, fructose 및 sucrose의 농도(C)에 따른 SMI의 관계를 곡선식으로 표시하면 다음과 같다. 각각 다른 농도를 가진 4가지 용액에서 용액의 농도에 따른 정자의 운동성은 서로 비슷한 경향이였다. 특히, 각각의 곡선식 모두 900~1,100 mM 사이에서 최고값을 나타내고 있었다.

$$\text{Mannitol : SMI} = -0.000004C^2 + 0.008810C - 0.447619 \\ (r^2=0.9093)$$

$$\text{Glucose : SMI} = -0.000005C^2 + 0.010310C - 0.161905 \\ (r^2=0.9357)$$

$$\text{Fructose : SMI} = -0.000006C^2 + 0.011411C - 0.222381 \\ (r^2=0.9596)$$

$$\text{Sucrose : SMI} = -0.000005C^2 + 0.009071C - 0.285714 \\ (r^2=0.8641)$$

삼투압 충격에 따른 정자의 운동성은 Fig. 3과 같다. 정장의 삼투질농도와 비슷한 150 mM NaCl에서는 노출시

회색액의 삼투질농도에 따른 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 운동성 변화

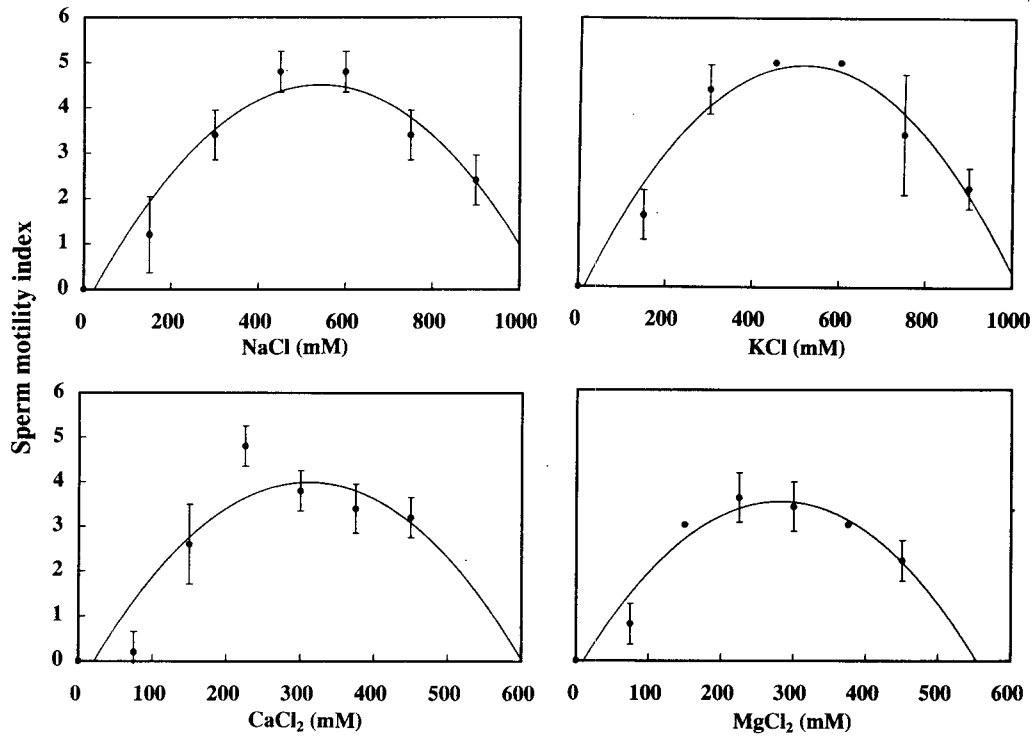


Fig. 1. Variation of the sperm motility index by electrolyte concentration in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Vertical bars indicate standard deviation.

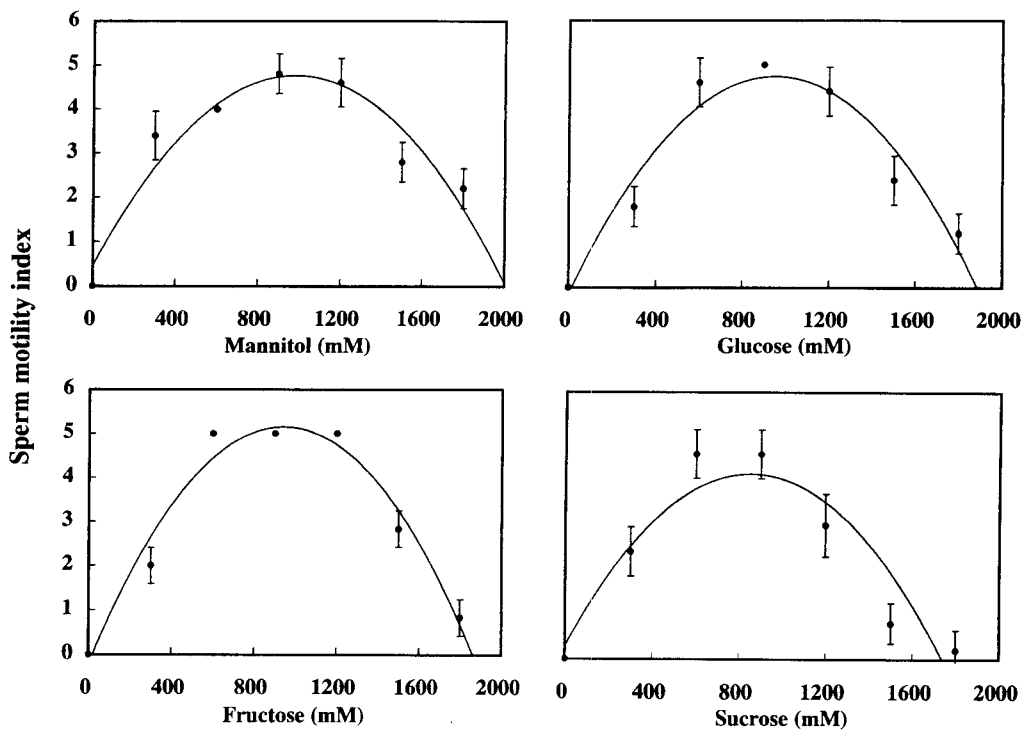


Fig. 2. Variation of the sperm motility index by non-electrolyte concentration in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Vertical bars indicate standard deviation.

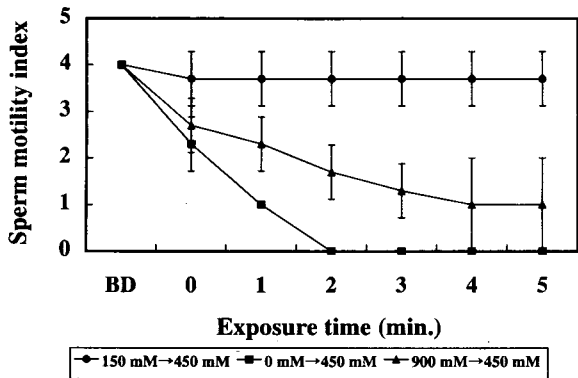


Fig. 3. Variation of the sperm motility index by osmotic shock in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. Vertical bars indicate standard deviation. BD: before dilution.

간이 5분까지 길어져도 운동성 감소없이 3.7 ± 0.6 의 SMI가 유지되었다. 그러나 증류수에 노출시킨 후 희석액의 농도를 450 mM NaCl (900 mOsm/kg)로 상승시킨 경우, 정자의 운동성은 노출직후부터 급격히 감소하여 노출 2분만에 SMI가 0이 되었다. 정자를 고장액인 900 mM NaCl (1,800 mOsm/kg)에 노출한 경우도 노출 후 시간 경과에 따라 정자의 운동성이 감소하여 노출 직후에 SMI가 2.7 ± 0.6 이었던 것이 5분후에는 1.0 ± 1.0 으로 감소하였으나 저장액인 증류수보다는 SMI가 높게 유지되었다.

고찰

체외수정을 하는 경골어류의 정자 운동개시와 환경수의 관계를 보면 잉어과 어류와 같은 담수어류의 정자는 정장보다 낮은 저장의 환경수에서, 해수어류의 정자는 고장의 환경수에서 운동이 개시되는 것으로 알려져 있다 (Morasawa and Suzuki, 1980; Takai and Morisawa, 1995). 한편 해수와 담수를 오가는 연어과 어류는 정장에 높은 농도의 K^+ 가 함유되어 있어 정자의 운동을 억제하지만, K^+ 농도가 상대적으로 낮은 담수나 인위적으로 K^+ 를 결여시킨 용액에 희석되면 정자의 운동이 개시된다. 이것은 이들의 정자가 정장의 K^+ 에 의해 운동이 억제되었다가, 방정시 정액이 담수에 희석될 때 정자의 K^+ 농도가 감소됨으로써 정자운동을 조절하는 세포내 조절기가 작동되기 때문이다 (Morisawa et al., 1983; Morisawa and Morisawa, 1990).

저자 등은 기존의 연구 (Chang et al., 1995)에서 이미 인공해수의 조성에 따른 삼투질농도의 변화가 감성돔 정자

의 운동에 많은 영향을 미친다고 보고한 바 있지만, 각 용액의 특성에 따른 정자의 운동 특성이나 비전해질 용액에서의 운동성 변화는 지금까지 조사하지 못했다. 따라서 이번 연구에서는 각 용액의 삼투질농도별 SMI의 변화와 함께 정장과 다른 삼투압 충격이 정자의 운동성에 미치는 영향을 파악하였다. 이 연구에서도 감성돔 정자는 희석액의 삼투질농도에 따라 운동성의 변화를 보였다. 전해질과 비전해질 용액 모두에서 삼투질농도의 증가에 따라 운동성이 증가하다가 어느 수준 이상부터는 다시 감소하는 동일한 패턴을 나타냈다. NaCl과 KCl에 희석한 경우, 희석액의 삼투질농도와 SMI 사이의 관계를 나타낸 곡선식에서 SMI의 최고값은 각각 536 mM과 507 mM에서 얻을 수 있었다. 비전해질인 mannitol, glucose, fructose 및 sucrose에서는 각각 1,101, 1,031, 951, 907 mM에서 SMI의 최고값이 계산되었다. 이러한 농도는 1,000 mOsm/kg 전후의 삼투질농도로 감성돔 정자는 희석액의 종류나 특성에 관계없이 해수와 비슷한 삼투질농도에서 가장 운동 활성이 활발하다는 것을 보여주고 있다.

Morisawa et al. (1992)은 정장과 등장인 용액에서 움직이지 않던 청어, *Clupea pallasii*의 정자가 해수와 같은 고장액에 희석되면 운동을 시작한다고 보고하였다. Morisawa and Suzuki (1980)는 복숭, *Fugu niphobles*, 대구, *Gadus morrhua macrocephalus* 및 가자미류의 움직이지 않던 정자가 해수나 해수와 동일한 삼투질농도를 가진 용액에서 운동을 개시한다고 하였다. 이들의 언급과 본 연구의 결과는 감성돔 정자의 운동성을 촉진하거나 억제하는 1차적 요인이 희석액의 삼투질농도임을 나타내며 이러한 외부 삼투질농도는 세포내 이온농도의 변화를 유발하여 정자의 운동성 변화에 영향을 미치는 것으로 추측된다.

외부 삼투질농도가 어류 정자의 운동성을 유발하는 1차적 요인이기는 하지만, 높은 삼투질 환경은 정자의 생존에 부정적인 영향을 미친다. 즉 삼투질농도가 감성돔 정장(382 mOsm/kg)보다 높은 해수(약 1000 mOsm/kg)는 정자의 운동을 유발시키는 요인이지만, 한편으로는 정자에게 치명적인 영향을 미친다. 정장보다 저장의 용액에 노출될 경우도 정자는 물을 흡수하여 팽창하게 되고 이러한 팽창은 원형질막에 심각한 피해를 입힌다. 감성돔의 경우 고장액에서 보다 저장액에서 더 큰 손상을 받는 것으로 나타났다. Strussmann et al. (1994)도 담수어류인 pejerrey, *Odontesthes bonariensis*의 정자를 고장액에 노출하면 삼투압 충격에 의해 손상을 받는다고 하였다. 즉 난

생 어류가 수정을 위해 방정하는 환경수가 정자의 생존에는 적합하지 않을 뿐만 아니라 정자의 운동 지속 시간을 단축시키는 요인이 되고 있다. 이러한 삼투압 문제는 난생 어류의 알과 정자를 인위적으로 수정을 시킬 때 고려되어야 할 중요한 요인이다. 만약 수정작업이 신속하게 진행되지 않는다면 정자는 운동성이나 수정능력을 잃을 뿐만 아니라 생존도 위협받을 것이다. 따라서 수정작업이 진행되는 동안 정자의 운동성을 높게 유지할 수 있는 회석액의 삼투질농도나 이온조성의 파악은 필수적이며 이에 대한 더욱 체계적인 연구가 요구된다.

요 약

삼투질농도가 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 운동성에 미치는 영향을 연구하였다. 감성돔 정자는 정장과 등장인 삼투질농도에서 운동성이 억제되었으나, 전해질(NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) 및 비전해질(mannitol, glucose, fructose, sucrose) 회석액의 삼투질농도가 증가할 때, 운동성을 획득하였다.

회석액의 삼투질농도에 의한 정자운동지수(SMI)의 변화는 포물선을 그렸다. 모든 회석액에서 SMI는 해수의 삼투질농도와 유사한 약 1,000 mOsm/kg에서 가장 높았고 그 이상에서는 다시 낮아졌다. 비록 정자의 운동성이 회석액의 삼투질농도에 의해 유발되고 해수와 비슷한 농도의 고장인 회석액에서 SMI가 가장 높았지만, 고장이나 저장의 회석액에 정자를 노출시키는 것은 정자의 운동성 감소를 유발하였고 생존에 유해하였다.

참 고 문 헌

Billard, R. and M.P. Cosson, 1992. Some problems

related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.*, 261 : 122-131.

Chang, Y.J., H.K. Lim and K.H. Kho, 1995. Properties of semen and sperm motility in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *J. Aquaculture*, 8 : 149-157. (in Korean)

Morisawa, M., 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, 2 : 605-615.

Morisawa, M., 1994. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zool. Sci.*, 11 : 647-662.

Morisawa, M. and M. Okuno, 1982. Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature*, 295 : 703-704.

Morisawa, M. and K. Suzuki, 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210 : 1145-1147.

Morisawa, M., K. Suzuki and S. Morisawa, 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.*, 107 : 105-113.

Morisawa, M. and S. Morisawa, 1990. In "Control of sperm motility: Biological and clinical aspects" Ed by C. Gagnon, CRC press, Boca Raron, 137-152.

Morisawa, M., S. Tanimoto and H. Ohtake, 1992. Characterization and partial purification of sperm-activating substance from egg of the herring, *Clupea pallasii*. *J. Exp. Zool.*, 264 : 225-230.

Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima, 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60 : 9-13.

Takai, H. and M. Morisawa, 1995. Changes in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J. Cell Sci.*, 108 : 1175-1181.