

In Vitro 고삼투압이 정자 원형질막의 Protein Tyrosine Phosphorylation에 미치는 영향

연세대학교 문리대 생명과학과, 연세대학교 이과대 생물학과*, 한림대학교 의과대학 생리학교실**,
아주대학교 의과대학 생리학교실***

오영근† · 장재호 · 최인호 · 정노필* · 신형철** · 곽병주***

국문초록: 정자의 원형질막은 삼투압에 의해서 영향을 받는다고 보고되고 있다. 이중 세포막내 분자구조의 변화 특히 막지질 구조의 변화와 동반되는 이온채널의 변화 그리고 Ca^{2+} 과 HCO_3^- 의 유동성과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 지금까지의 연구보고에 의하면, 정자의 첨체반응 (acrosome reaction)이 일어날 경우 protein tyrosine phosphorylation이 증가되는데 이것은 cAMP, protein kinase A 등을 통하여 작용되는 것으로 보고되고 있다. 막의 지질변화를 유도하는 물질로 일종의 sterol acceptor인 BSA가 알려져 있는 바, 실제로 BSA가 막지질 성분에 미치는 영향을 관찰한 결과 cholesterol이 유출되고 이온 등의 유동성 변화가 일어나, 이 유동성 변화가 정자의 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cAMP를 증가시키고, PKA가 활성화되어 결과적으로 protein tyrosine phosphorylation이 유도된다고 보는 것이다. 첨체반응과 protein tyrosine phosphorylation과는 밀접한 관계가 있는 것으로 사료되고 있다. 본 연구는 정자 원형질막에서 cholesterol이 유출되어 protein tyrosine phosphorylation이 유도될 때, BSA와 같은 sterol acceptor가 작용할 것이라는 전제하에, 고삼투압 하에서 탈수로 인해 원형질막이 위축되더라도 sterol acceptor가 존재한다면 막지질 성분의 구조적 변화가 억제될 수 있을 것이라는 가설을 설정하였다. 실험결과, 저온 및 고삼투압 하에서 정자운동은 감소되지만 원형질막의 구조적 변화는 없고, 삼투압에 대한 반응정도는 원형질막을 통한 수분이동과 세포용적 변화에 따라 비례적으로 일어난다고 하는 사실을 발견하였다. 이 결과는 정자보존에 있어서 저온변화에 영향을 미치는 여러 인자들 특히 protein tyrosine phosphorylation의 증가와 밀접한 관계가 있음을 시사해 준다. 또한 sterol acceptor로 알려진 BSA는 삼투압이 변화되더라도 역시 중요한 인자로 작용할 수 있음을 알 수 있었으며, 특히 고삼투압으로의 변화는 cAMP와 protein kinase A를 거치는 신호전달과정에 있어서 중요한 요인이라는 사실을 확인할 수 있었다.

서 론

포유동물의 정자 (sperm)는 사정 (ejaculation) 즉시 수정 (fertilization)될 수 없고, 일정기간 동안 수컷의 부정소나 교미 후 암컷의 생식도 내에 머물러 있어야

*는 문 접 수: 2000년 11월 1일
수정 재접수: 2000년 12월 4일

†별책 요청 저자: 오영근, 연세대학교 문리대학 생명과학부
Tel. 033) 760-2241

*이 연구는 1998년도 교육부 기초과학 연구비 지원에 의한 결과임 (Project No. 97-4418).

만 수정능력 (capacitation)을 갖게 되는 것으로 알려져 있다. 일부 동면하는 암컷 박쥐의 경우¹⁾, 저체온 (10°C 내외) 상태에서도 생식도내 (난관협부)에서 4~5개월간 생존하고 있다가, 동면이 끝나는 4월초에 배란되는 난자와 수정되는 특이한 정자저장형 생식양식을 보이며, 고삼투압 하에서 원형질막이 안정적으로 유지되어 생존하고 있는 후, 동면기간이 지나면 생식능력을 다시 회복하는 사실도 보고되었다^{2,3)}.

그러나 한랭한 암컷의 자궁 난관과 같은 생식도내에서 어떻게 그와 같이 장기간 동안 정자가 생존하고 있을 수 있는지에 대한 분명한 해명은 아직 된 바가

없고, 정자 저장기전에 대한 생리 생화학적 설명도 이루어지지 않고 있다. 지금까지의 연구보고는 정자자체의 출현빈도나 저장환경의 특성 등에 대한 단편적인 관찰이었으며, 특히 정자의 생존기전 중 원형질막의 신호전달과정을 통한 세포대사적 접근방법을 시도한 연구는 거의 없었다고 본다.

박쥐 수컷의 부정소내 정자는 고삼투압 상태에서 생존하고 있으며, 이와 같은 고삼투압의 유지가 수분을 유출시켜 물분자와 동반되는 에너지소비를 감소시킴으로서, 불활성화된 상태에서 장기간 생존하고 보전될 수 있으며, 다시 동면에서 깨어나는 시기가 되면 호르몬과 같은 특정인자가 삼투압을 낮추게 되면, 정자가 다시 활성화 된다고 하였다³⁾. 이와 같이 정자가 고삼투압 하에서 불활성화 된다는 사실은, 정자가 원형질막을 통한 대사활동이나 수정 전에 이루어져야 할 일종의 프로그램화된 세포활동이 억제되고 있음을 의미한다고 볼 수 있다. 많은 연구보고에 의하면, 일반적으로 정자가 수정능력을 얻기 위해서는 protein tyrosine phosphorylation 과정을 통하여 운동성을 회복하고 침체반응이 일어나야 되는 것으로 알려져 있다^{1,12,15-18)}. 한편 정자는 체내에 존재하는 일종의 sterol acceptor가 원형질막의 cholesterol을 유출시키면 이온채널이 변화되고, 이 이온채널의 변화는 K^+ , Ca^{2+} 그리고 HCO_3^- 등의 이온변화를 야기 시킴으로서 cAMP의 증가를 유도하여, 궁극적으로 정자운동을 증강시켜 난자에로의 접근과 정자두부의 침체반응이 일어나 수정 (fertilization)에 이르게 된다고 하였다^{10,14,18)}.

따라서 본 연구는, 고삼투압 하에서 정자의 원형질막이 불활성화 된다는 전제하에, sterol acceptor가 존재하는 조건하에서의 여러 가지 생리적 변수 (정자의 운동성, 원형질막의 변화, protein tyrosine phosphorylation의 증감 등)를 관찰 분석함으로써, 고삼투압 유지가 정자의 장기간 생존을 가능하게 하는가를 규명하기 위하여 시도되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 정자표본

실험동물은 성숙한 수컷 생쥐 (male mice)를 사용하였다. 정자표본은 다음과 같은 처리를 하여 사용하였다. 부정소를 적출하여 잘게 찢은 다음 Ca^{2+} 또는

BSA가 없는 HM 배지 0.5 ml에 5분 동안 배양시킨 다음, 정자현탁액을 같은 배지 10 ml로 800 ×g, 10분 동안 상온에서 세척하였다. 세척 후 정세포를 $5\sim 10 \times 10^7$ cells/ml로 조정된 후, 실험에 따라 적절한 배지로 10배 희석시켜 2시간 동안 배양하였다. 배양한 배지는 상온에서 5000 ×g, 1분 동안 원심분리시킨 후 세포 괴를 1 ml PBS로 세척한 다음, 2-mercaptoethanol이 없는 sample buffer로 resuspending시켜 5분 동안 끓였다. 다음 5000 ×g로 3분 동안 원심분리 후, 상층액은 제거하고 2-mercaptoethanol을 농도가 5%가 되게 첨가시킨 후, 5분 동안 끓인 다음 전기영동실험 (SDS-PAGE)에 사용하였다.

본 실험에 사용된 대부분의 시약은, Sigma사 (Saint Louis, MO)의 1등급 시약이었으며, antiphosphotyrosine antibody (clone 4G10)는 UBI제품을, Immobilon P는 Millipore사 제품을, 그리고 EcoLite scintillation fluid는 ICN사 제품을 사용하였다.

2. 실험배지의 준비

실험배지는 modified Krebs-Ringer bicarbonate medium을 사용하였다. 처음에는 Ca^{2+} 과 BSA를 배제시킨 상태에서 준비하여, 0.20 μm filter로 여과시킨 후 -20°C에서 보관하다가 사용하였다. 다음 실험용 배지는 Ca^{2+} (1.7 mM), pyruvate (1 mM) 그리고 BSA (3 mg/ml)를 첨가한 후, pH 7.3으로 조절한 다음 사용하였다. 저삼투압 배지 (300 mOsmol kg^{-1} 이하)는 증류수로 일정한 비율로 희석시켜 제조하였고, 고삼투압 배지 (500, 800, 1000, 1300 mOsmol kg^{-1})는 1 M sucrose 용액으로 희석시켜 제조하였다. 삼투압은 freezing depression osmometer (Precision Systems Inc.)를 사용하여 측정하였다.

3. 정자의 운동성 측정

정자의 운동성은 각각의 실험에 따른 배지 내에서 배양시킨 후, computer-associated semen analysis (CASA)를 적용하여 측정하였다.

4. 원형질막의 Integrity 관찰

배지 내에서 배양시킨 정자 현탁액에 5 μl H258를 넣은 다음 정자의 원형질막의 integrity를 관찰하였다. 5분 후 결합되지 않은 H258을 제거하기 위하여, 30 μl

STDNA를 넣은 후에 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 전기영동 및 Immunoblotting

전기영동실험은 10% gels에서 시행하였다. Immobilon P로 단백질을 전기영동시키는 실험은 Towbin 등¹⁴⁾의 방법에 따라 100 V (일정전압), 4°C에서 2시간 동안 시행하였다. Immunodetection은 Kalab 등⁹⁾의 방법에 따라 상온에서 4G10 monoclonal antibody와 ECL kit를 사용하였다.

6. 통계 처리

실험결과와 통계 분석은 Zar 등¹⁹⁾의 방법에 의거

하여 Student *t* test를 적용하였다.

결 과

1. 삼투압과 온도가 정자운동성에 미치는 영향

300~500 mOsmol kg⁻¹사이의 범위에서 정자의 운동성은 균일한 활동을 보였다. 그러나 200 mOsmol kg⁻¹에서 운동성이 감소되다가 저삼투압인 100 mOsmol kg⁻¹ 이하에서는 거의 대부분의 정자가 운동성을 보이지 않았다. 한편 고삼투압 상태인 500 mOsmol kg⁻¹ 이상에서는 운동성이 20% 내외로 감소되기 시작하여 1000 mOsmol kg⁻¹ 이상에서는 운동성이 현저히 감소(80~90%)되고 있음을 발견하였다 (Fig. 1).

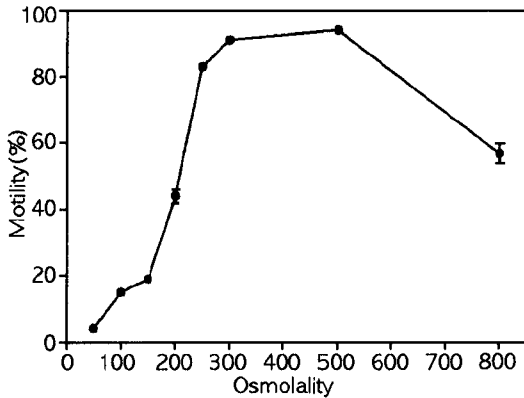


Fig. 1. Effects of osmolality on the motility of mouse spermatozoa. Samples were cultured over the osmotic range of 50~1000 mOsm kg⁻¹.

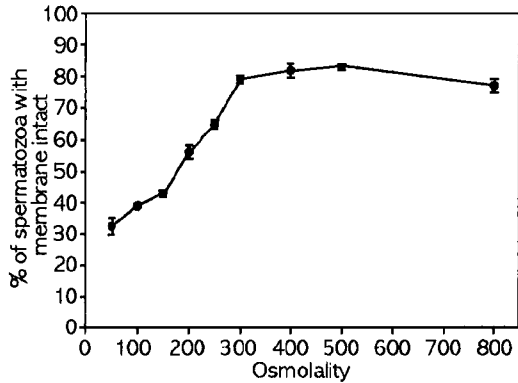


Fig. 3. Effects of osmolality on the plasma membrane of spermatozoa at 10°C.

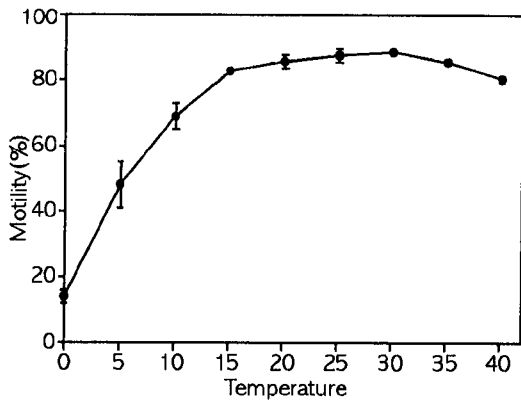


Fig. 2. Effects of temperature on the motility of spermatozoa. Samples were cultured over the osmotic range of 50~1000 mOsm kg⁻¹.

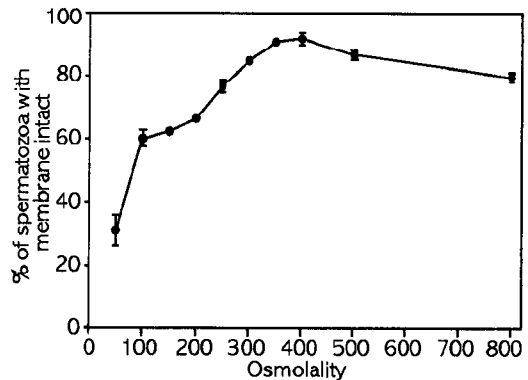


Fig. 4. Effects of osmolality on the plasma membrane of spermatozoa at 25°C.

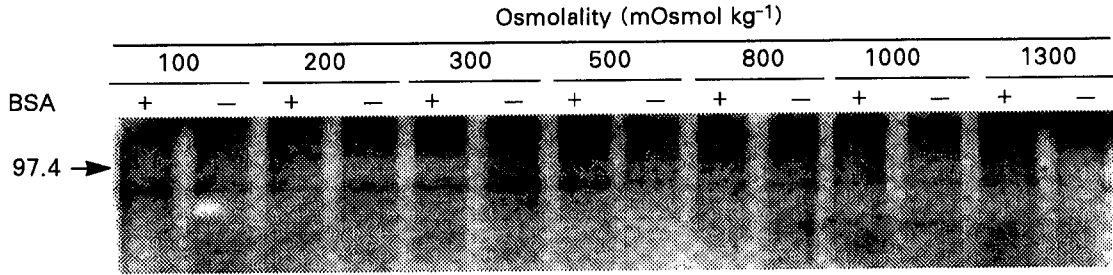


Fig. 5. Effect of hyperosmolality on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation in cauda epididymal sperms in HM medium (without NaHCO_3).

온도가 정자운동성에 미치는 영향을 보면, 20~40°C의 실험구간에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 25°C 이하의 저온 상태에서는 운동성이 현저히 감소되는 양상을 보였다 (Fig. 2).

원형질막에 미치는 삼투압의 영향은, 등삼투압 범위 내에서는 각 삼투압마다 유의한 차이를 보이지 않았으나, 고온 (25°C)에서 보다는 저온 (10°C 이하)에서 다소간 원형질막에 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Fig. 3, 4).

2. 등장액으로 환원시 원형질막에 미치는 영향

등장액으로 환원시, 정자의 운동성과 첨체반응에 유의차가 나타나지 않는 것으로 보아, 원형질막에 미치는 영향은, 등장액으로 환원되기 이전에 이미 나타나는 것으로 관찰되었다.

3. BSA와 HCO_3^- 가 protein tyrosine phosphorylation에 미치는 영향

두 개의 실험군으로 나누어 시행한 바, 첫 번째 HCO_3^- 가 첨가되지 않고 BSA (3 mg/ml)와 CaCl_2 (1.17 mM)만이 첨가된 배지에서 배양된 정자의 경우, 등삼투압을 포함한 고삼투압 저삼투압 모두에서 공통적으로 protein tyrosine phosphorylation이 일어나지 않았다 (Fig. 5). 두 번째 BSA, CaCl_2 , HCO_3^- 모두 첨가된 배지에서 배양된 정자의 경우에는, protein tyrosine phosphorylation이 일어났다 (Fig. 6).

4. 삼투압의 변화가 protein tyrosine phosphorylation에 미치는 영향

고삼투압 하에서 필요한 모든 인자를 제공한 바, 삼투압이 높아질수록 protein tyrosine phosphorylation이

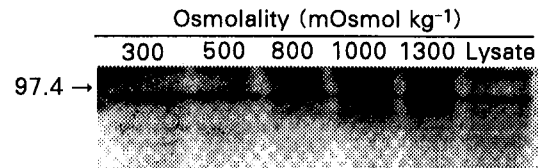


Fig. 6. Effect of hyperosmolality on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation in cauda epididymal sperms in HMB medium (with NaHCO_3).

감소되었다. 특히 1000 mOsmol kg^{-1} 이상의 삼투압 하에서는, 실험군은 대조군과 비교하여 별 차이를 보이지 않았다 (Fig. 6).

고찰

정자의 수정능 획득 (capacitation) 또는 성숙과정의 기전에 대한 분자생물학적 연구는 많이 이루어져 왔으나, 어떤 인자에 의해 활성화되어 신호전달이 이루어지는지에 대한 연구는 많지 않다. 더욱이 동면동물의 경우, 교미 후 암컷의 생식도 내에서 장기간 생존하고 있는 정자의 원형질막의 특이적 양상에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다^{3,4)}.

박쥐의 경우, 동면 (hibernation)기간 동안 정자가 불활성 상태에서 생존하고 있는 것은, 정자가 고삼투압 상태로 유지되기 때문이라고 알려져 있는 사실에 주목하여, 이 원리를 정자의 저온보존에 응용할 수 있을 것으로 사료되어, 정자보존에 필요한 저온보존물질을 규명하고 삼투압과 저온보존과의 연관성을 파악하기 위한 노력이 있었다^{3,12)}. 정자의 원형질막을 통한 수분의 이동율은, 저온보존물질의 적정량을 조절하는데 매우 중요하다. 정자의 원형질막은 저삼투압 하에서 상당히 낮은 내구성을 보이며 불활성 상태를 나타

내는데, 본 실험에서 약 250 mOsmol kg⁻¹ 이하에서는 운동성이 급격히 하강하여 등삼투압 시의 25~50% 이하의 낮은 운동성을 나타내었다.

또한 정자는 온도변화에 매우 민감하여 저온(0~10°C)에서 원형질막의 생리적 및 화학적 변화가 야기되어, 수정에 직접 영향을 미치는 대사활동과 침체반응에도 반응될 수 있다고 한다^{3,4)}. 이와 같은 저온에서의 원형질막의 변화는, 여러 동물세포에서도 발견되는 현상인 점으로 미루어 보아, 실질적으로 정자의 저온보존온도의 적정성에 대하여 재고하여야 될 것으로 본다. 그것은 온도변화에 따라 원형질막의 수분 이용 에너지의 양이 결정되고 저온보존물질의 투과성이 좌우될 수 있다는 점에서, *in vivo* 정자의 저온환경은 정자성숙의 신호전달과정에 큰 영향을 주게 될 것이기 때문이다.

정자는 삼투압에 의해서 막지질 구조에 변화가 생길 수 있으며, 특히 Ca²⁺과 HCO₃⁻의 유동성에 영향을 받게 되는데 이것은 세포내 구조의 소위 lateral phase separation에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다^{5,6,8,13)}. 지금까지 알려진 바에 의하면, 정자에 침체반응이 일어나면 protein tyrosine phosphorylation이 증가⁶⁻¹⁸⁾되는데, 이 증가현상은 cAMP와 protein kinase A에 의하여 일어나며¹²⁾, 이 때 막의 지질변화를 유도하는 물질로 알려진 일종의 sterol acceptor도 작용하는 것으로 보고되고 있다. BSA가 막지질 성분에 미치는 영향을 관찰한 바, cholesterol이 유출됨으로써 이온의 유동성 변화가 일어나 정자의 adenylyl cyclase를 활성화시켜, cAMP를 증가시키고 PKA를 증가시켜 protein tyrosine phosphorylation이 유도되기 때문에, 침체반응의 증가와 protein tyrosine phosphorylation과는 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다^{7,17,18)}.

본 연구는 정자의 원형질막에 있어서, cholesterol이 유출되어 protein tyrosine phosphorylation이 유도되는 과정을 검정하는 실험으로서, BSA와 같은 sterol acceptor가 막지질의 성분을 변화시킨다는 전제하에, 생체내 정자보존의 중요한 인자인 고삼투압 하에서 탈수로 인한 위축이 sterol acceptor의 존재 하에서도 억제되어 protein tyrosine phosphorylation이 감소될 수 있는가를 규명하기 위하여 시도되었다. 이 시도에서 protein tyrosine phosphorylation이 감소된다면, 막지질의 변화와 막이온채널의 변화가 adenylyl cyclase에 직접 관

련되는 Ca²⁺과 HCO₃⁻와 같은 이온의 유동성을 변화 시킴으로서, 침체반응이 유도되어 궁극적으로 수정에 까지 이르게 될 수 있음을 시사해 주는 것이라고 사료된다. 따라서 고삼투압 하에서의 protein tyrosine phosphorylation 실험은 매우 의미 있는 시도라고 사료되고 있다^{11,15,16)}.

이미 연구 보고된 논문결과와 마찬가지로, HM buffer에서 배양된 정자의 경우 BSA 첨가 여부와 관계없이, protein tyrosine phosphorylation이 일어나지 않았으며, 고삼투압과 저삼투압 하에서도 역시 일어나지 않은 것으로 보아, BSA 첨가만으로 정자의 운동성과 침체반응이 유도되는 것이 아니라는 사실을 알게 되었다. 배지에 10 mM의 HCO₃⁻이 첨가된 경우 protein tyrosine phosphorylation이 유도되는 것으로 미루어, 막구조의 변화에서 BSA의 역할이 크다는 사실도 간파되었다. 즉 HCO₃⁻은 세포의 유동성 활성화에서 중요한 작용을 하지만, 이러한 이온의 유동성 변화를 유도하는 또 다른 요소 중의 하나가 BSA라고 하는 사실을 발견하였다. 따라서 HCO₃⁻은 생체내 신호전달 과정에서 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 사료되었다.

또한 삼투압이 증가됨에 따라 protein tyrosine phosphorylation이 등삼투압 상태와 비교하여 감소되는 현상을 관찰한 바, 이것은 동면박쥐 등의 경우에서 볼 수 있는 것과 마찬가지로, 고삼투압 하에서 탈수로 인한 에너지소비가 감소됨으로서, 정자 자체의 운동성이 감소되어, 결과적으로 막성분의 변화가 억제되어 정자의 생명력을 연장시키고 있다고 추정된다. 말하자면 고삼투압 상태가 HCO₃⁻의 흡수를 저해하는 것으로 생각된다.

정자의 운동성 실험결과에서 보면, 일정한 삼투압 범위 (대략 300~500 mOsmol kg⁻¹)를 제외하면, 운동성이 모두 감소되었고, 고삼투압으로 갈수록 운동성이 급격히 감소되는 것으로 보아, 고삼투압 상태에서 정자의 protein tyrosine phosphorylation이 유도되지 않은 결과, 운동성이 급감되는 것이라고 사료되었다.

온도의 변화 역시 동면동물의 정자보존에 있어서 매우 중요한 인자가 된다. *in vitro* 20°C 이하에서, 정자의 운동성이 급격히 감소되는 것을 관찰한 바, 이것은 저온환경이 정자의 막구조에 영향을 미치고 있음을 시사해 주는 것으로서, 역시 이와 같은 구조적 변

화가 protein tyrosine phosphorylation과 같은 기능적인 인자에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

본 실험적 연구결과에 의거해 보건대, 저온에서 그리고 고삼투압 하에서는 정자의 운동성이 감소되고, 원형질막의 구조적 변화가 억제되며, 원형질막의 수분 이동과 protein tyrosine phosphorylation이 유도되지 않음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 정자보존기전에 있어서, 저온환경에 영향을 주는 여러 인자들은 정자의 운동성과 그리고 protein tyrosine phosphorylation의 유도 내지 증가와 밀접한 관계가 있다고 하는 사실을 뒷받침하고 있다. sterol acceptor로 알려진 BSA가 첨가된 상태에서도 삼투압이 중요한 인자로 작용하고 있음을 보여줌으로써, 고삼투압이 cAMP와 protein kinase A를 거치는 신호전달과정에 있어서 중요한 역할을 한다는 사실도 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M and Irvine, DS (1998): A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*, **111**: 645-656.
- 2) Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS and Moss SB (1996): Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol*, **180**: 284-296.
- 3) Crichton EG, Hinton BT, Pallone TL and Hammerstedt, RY (1994): Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *Am J Physiol*, **267**: 363-1370.
- 4) Crichton EG, Krutzsch PH and Yanagimachi R (1993): Stability of the sperm plasma membrane of hibernating bats (*Myotis velifer*) compared with other mammals. *J Reprod Fertil*, **97**: 1-4.
- 5) Davis BK (1981): Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci*, **78**: 7510-7514.
- 6) Garde J and Roldan ERS (2000): Stimulation of Ca^{2+} -dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A2. *J Reprod Fertil*, **118**: 57-68.
- 7) Galantino-Homer H, Visconti PE and Kopf GS (1997): Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod*, **56**: 707-719.
- 8) Good DW (1995): Hyperosmolality inhibits bicarbonate absorption in rat medullary thick ascending limb via a protein-tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, **270**: 9883-9889.
- 9) Mori T, Oh YK and Uchida TA (1982): Sperm storage in the oviduct of the Japanese greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum nippon*. *J Fac Agr*, **27**: 47-53.
- 10) Muller G, Grey S, Jung C and Bandlow W (2000): Insulin-like signaling in yeast: modulation of protein phosphatase 2A, protein kinase A, cAMP-specific phosphodiesterase, and glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities. *Biochemistry*, **39**: 1475-1488.
- 11) Nadkarni V, Gabbay KH, Bohren KM and Sheikh-Hamad D (1999): Osmotic response element enhancer activity. Regulation through p38 kinase and mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*, **274**: 20185-20190.
- 12) Saito K, Kinnoshita Y, Kanno H and Iwasaki A (1996): The role of potassium ion and extracellular alkalization in reinitiation of human spermatozoa preserved in electrocyte-free solution at 4 degrees C. *Fertil Steril*, **65**: 1214-1218.
- 13) Suzuki F and Yanagimachi R (1989): Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gem Res*, **23**: 335-347.
- 14) Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979): Elec-

- trophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*, **76**: 4350-4354.
- 15) Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning XP, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG and Kopf GS (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*, **274**: 3235-3242.
- 16) Visconti PE, Johnson LR, Oyaski M, Fornes M, Moss SB, Gerton GL and Kopf GS (1997): Regulation, localization and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol*, **192**: 351-363.
- 17) Visconti PE, Ning XP, Fornes MW, Alvarez JG, Stein PS, Connors SA and Kopf GS (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol*, **214**: 429-443.
- 18) Warner T and Zar JH (1982): Fatty acid composition of brown fat and brain fat of the little brown bat, *Myotis lucifugus*, during hibernation. *Comp Biochem Physiol*, **73(3)**: 63-65.
- 19) Zar JH (1996): "Biostatistical Analysis" Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

=Abstract=

***In vitro* Effect of High Osmolality on Plasma Membrane Activities
in the Spermatozoa**

**Yung-Keun Oh[†], Jae-Ho Chang, In-ho Choi, Noh-Pal Jung*,
Hyung-Cheul Shin** and Byoung-Ju Kwak*****

Department of Life Science, Faculty of Natural Science, Yonsei University, Wonju

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul**

*Department of Physiology, College of Medicine, Hanlim University, Chunchon***

*Department of Physiology, College of Medicine, Aju University, Suwon****

It has been reported that plasma membrane activity of the spermatozoa may be susceptible to be influenced by extracellular osmolality and such membranous changes involve intracellular molecular changes, special regard to the structure of membranous lipids, and the accompanying ion-channel of which are closely related with their fluidity of Ca^{2+} and HCO_3^- . It is of common recognition that a certain kind of sterol acceptor player an important to induce lipid fluctuation of the sperm plasma membrane which have been influenced by BSA administration and came in effect to outflow of cholesterol from the spermatozoa and resulted in changes of ionic fluidity to facilitate adenylyl cyclase, and to induce protein tyrosine phosphorylation by increase of cAMP and activation of PKA. Thus it seems likely that an augmentation of the acrosomal reaction is closely related with protein tyrosine phosphorylation.

The following experimental results were obtained in the present study; Under the high osmolality conditions, the spermatozoa motility declined significantly and the structural change of the plasma membrane diminished to confirm that the response degrees to the osmolality depended upon the water transfer volume through the plasma membrane and the changes of cellular volume. Those experimental results suggest that a physiological parameter such as low temperature condition played an important role for presentation of spermatozoa and that inducement of spermatozoa activation for reinforcement of protein tyrosine phosphorylation. On the other hand, it seemed likely that the BSA administration as one of sterol acceptors might represent a key role also under the high osmolality condition and their result also suggests that osmolality change, special regard to high osmolality condition may play an important role also in the processes of signal transmission

Key Words: High osmolality, Plasma membrane, Protein tyrosine phosphorylation, Spermatozoa

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(4): 237-244, December, 2000]

[†]Corresponding author