

돼지 동결정액의 배양에 따른 체외수정능력과 Glycosidase Activity의 변화

황인선 · 정희태 · 양부근 · 김정익 · 박춘근*

강원대학교 동물자원과학대학

Changes of Glycosidase Activity and Fertilizing Ability *in Vitro* by Incubation of Frozen-Thawed Spermatozoa in the Pig

Hwang, I. S., H. T. Cheong, B. K. Yang, C. I. Kim and C. K. Park

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

ABSTRACT

This study has evaluated effect of the spermatozoa incubation on the glycosidase activity and fertilizing ability *in vitro* in the pig. To identify sperm glycosidases specific for sugar residues found in the zona pellucida of pig oocytes, the spermatozoa were treated experimentally and assayed for activities of α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, β -D-galactosidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (β -GlcNAc'ase). The glycosidases activity were higher in spermatozoa incubated for 2h than without incubation. The β -GlcNAc'ase activity was at least two-fold higher than other glycosidase regardless of spermatozoa incubation. In the same glycosidases, the activity had a tendency to increase as time of spermatozoa incubation was prolonged, but there were no differences in spermatozoa incubated during the various periods (4~24h). The percentages of spermatozoa that reached acrosome reaction were affected by glycosidases in the medium ($P<0.05$, for mannosidase), and were higher in spermatozoa with that than without incubation. On the other hand, the spermatozoa motility were decreased with incubation periods, but no effects by different glycosidases on the change of sperm motility during the various periods of incubation. In other experiment, the binding and penetration of pig spermatozoa were tested with oocytes matured *in vitro* in the presence of various glycosidase. The penetration rates were decreased with incubation of spermatozoa when oocytes were inseminated in medium with different glycosidases. These rates were higher in spermatozoa non-incubated than with incubation for 2h ($P<0.05$ for GlcNAc'ase; $P<0.01$ for control group). The sperm-zona binding rate in control group were higher than in medium with glycosidases. In addition, the highest binding rate were obtained in medium with GlcNAc'ase. In all glycosidases, the sperm-zona binding rate in spermatozoa without incubation were higher than incubation for 2h. The significant differences were obtained in spermatozoa treated with α -D-mannosidase ($P<0.05$). These results suggest that β -GlcNAc'ase is present mainly in the plasma membrane of pig spermatozoa. It was also shown that the glycosidase activity were increased in all

* 이 논문은 2000년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2000-G00052).

† Corresponding author : 박춘근, 우)200-701 강원도 춘천시 효자2동 192-1 강원대학교 동물자원과학대학 동물자원학부, 전화 033-250-8621, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

glycosidases in spite of low sperm-zona binding rate and penetration rates by spermatozoa incubation.

(Key words : Fertilization ability, Glycosidase activity, *In-vitro*, Pig, Spermatozoa incubation)

I. 서론

정자가 난자내에 침입하는 과정에서 투명대의 표면에서 일어나는 최초의 정자결합은 매우 중요한 의미를 가진다. 여러 동물종에서, 정자내에 존재하는 lectin과 같은 단백질 및 효소 등의 분자는 투명대내에 존재하는 당단백질의 하나인 oligosaccharide를 인지하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 lysosomal glycosidase는 glycoprotein, glycolipid 및 glycosaminoglycan의 구성성분인 monosaccharide의 가수분해시 촉매작용을 한다. 그러나 매우 높은 특이성을 지닌 정자의 glycosidases는 효소기질을 안정화시키며, 투명대내에서 촉매제로서의 작용없이 glycoprotein의 oligosaccharide잔기를 합성시킨다(Macek 등, 1991). 지금까지의 연구를 통하여 α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, β -D-galactosidase 및 N-acetyl- β -D-glucosaminidase(β -GlcNAc'ase)을 포함한 여러 종류의 glycosidase가 다양한 동물종의 정자내에 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 이들 glycosidase는 정자와 난자의 상호작용에 관련하는 것으로 보인다. 이와 같은 사실은 포유류에서 한 개 이상의 receptor가 정자와 난자의 결합에 관련되어 있고, 여러 분자내 상호작용에 의해 정자-난자의 인지와 결합을 조절하는 것으로 추측된다(Bleil 등, 1988).

한편, 돼지 정자의 plasma membrane에서 55kD의 단백질과, 침체에서 53kD의 단백질이 발견되었는데, 이들은 proacrosin으로 정자의 투명대 접합과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 최근의 연구에서, α -L-fucose, β -D-galactose, α -D-mannose 및 β -GlcNAc'ase 잔기가 돼지 난자의 투명대내에 서로 다른 양으로 여러 부위에 존재하는 것으로 확인되었으며, 특히 β -D-galactose와 α -D-mannose 잔기는 정자와 투명대의 초기 접합과 침입에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Majumber와 Turkington, 1974). 이러한 여러 잠재적인 투명대 접합 효소가

몇몇 포유동물의 정자에서 확인되었지만, 돼지의 경우 이들 효소의 존재 여부 및 존재 부위에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 난자의 투명대에 존재하는 당잔기에 대한 glycosidase의 특이성은 돼지 정자에서도 나타나며, 정자-난자의 상호작용에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 따라서 본 연구에서는 glycosidase의 세포내 분포와 활성 및 glycosidase inhibitor의 존재하에서 난자와 정자의 접합과 체외에서의 정자침입에 대한 영향을 밝히고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 배양액

정자의 glycosidase분석을 위한 기본배양액은 120mM NaCl, 2mM KCl, 2mM CaCl₂, 10mM NaHCO₃, 1.2mM MgSO₄, 5.6mM D-glucose, 1.1mM sodium pyruvate, 25mM 3-[N-tris (hydroxymethyl) methylamino]-2-hydroxy propanesulfonic acid (TAPSO), 18.5mM sucrose 및 3mg/ml bovine serum albumin으로 구성된 mKRB액을 이용하였다. 한편, 체외에서 난자의 성숙과 수정을 위한 배양액은 3.05mM D-glucose, 2.92mM hemicalcium lactate, 0.91mM sodium pyruvate, 75 μ g/ml potassium penicillin G, 50 μ g/ml streptomycin sulfate와 10% fetal calf serum이 첨가된 TC-199액을 이용하였다.

2. Glycosidase 분석을 위한 정자의 준비

돼지동결정액(2 straws)은 37 $^{\circ}$ C의 waterbath내에서 30초간 용해한 후 2ml의 BTS(Beltsville Thawing Solution)를 첨가하여 희석한 후 10분간 37 $^{\circ}$ C의 waterbath내에서 평형시켰다. 평형 후 2ml의 정액을 65%와 70%의 percoll층 위에 놓고 20 $^{\circ}$ C에서 15분간 2000g에서 원심분리하였다. 원심분리 후 65%층의 정자를 caffeine이 첨가되지 않은 전배양액

을 이용해 250g에서 10분간 2회 원심분리하여 정자농도를 조정하면서 재부유시켰다. 정자액 900 μ l에 30mM n-octylglucoside가 첨가된 mKRB액 100 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 glycosidase activity를 측정하였다.

3. Glycosidase Activity의 측정

Glycosidase activity는 p-nitrophenyl 유도물질 (α -L-fucoside, β -D-galactoside, α -D-mannoside와 β -GlcNAc'ase)로 부터 p-nitrophenyl을 유리하는 원리에 의해 측정하였다. 즉 정자액 100 μ l에 각각의 2 mM p-nitrophenyl 유도물질이 함유된 액(pH 5.2) 100 μ l를 첨가하여 39°C에서 4시간 배양한 후 그 반응을 정지시키기 위하여 1M의 Na₂CO₃를 1ml 첨가하였다. p-nitrophenyl 유도물질액은 protease inhibitor cocktail(PIC)이 첨가된 citrate-phosphate buffer로 조성되었으며, glycosidase activity는 spectrophotometer를 이용해 측정하였다.

4. Sperm-Binding과 Penetration Assay를 위한 정자와 난자의 준비

도축장에서 회수한 난소의 난포로부터 회수한 난자는 성숙배양액(TC-199 medium)내에서 3회 세척 후 같은 액 100 μ l 소적내에서 42~44시간 체외 성숙배양을 실시하였다. 배양 후 난자는 0.1% hyaluronidase처리에 의해 난구세포를 제거한 후 3회 세척하여 50 μ l의 체외수정 소적에 넣어두었다. 체외수정액은 여러 농도의 glycosidase inhibitor와 10mM caffeine이 첨가된 TC-199액을 사용하였다.

【연구 1】 Glycosidase activity의 분석

동결-융해정자는 5mM의 caffeine이 함유된 TC-199배양액 7ml를 첨가하여 1500rpm에서 10분간 2회 원심분리하였다. 원심분리 후 glycosidase의 분석을 위하여 펠렛에 같은 배양액을 첨가하여 정자농도를 1×10^6 /ml로 조절하였다. 여기에 citrate phosphate buffer(60mM trisodium citrate, 40mM NaH₂PO₄, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM KCl, 1mg/ml BSA, protease inhibitor cocktail, pH 5.0)내에 2mM의 α -L-fucoside, β -D-galactoside, α -D-ma-

noside와 β -GlcNAc'ase를 100 μ l씩 첨가하여 incubator내에서 0, 1, 2, 3, 4시간 배양한 후 1ml의 1M Na₂CO₃으로 반응을 정지시켜 spectrophometer를 이용한 glycosidase activity의 측정시까지 냉장 보존하였다.

【연구 2】 정자의 난자내 침입능력 평가와 glycosidase activity의 변화

정자의 투명대내 침입능력을 분석하기 위하여 연구 1의 방법에 의해 처리한 정자를 이용하여 체외수정을 실시하였다. 한편 미성숙난자는 3.05mM glucose, 0.32mM Ca-lactate, 2.5mM Hepes, 10% FCS, 0.2mM Na-pyruvate 및 10% porcine follicular fluid를 첨가한 TC-199액을 이용하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 42~44시간 성숙배양 후 체외수정에 이용하였다. 체외수정 후 정자의 난자내 정자 침입상황을 검토하였으며, 정자의 glycosidase activity의 변화를 검토하였다.

【연구 3】 정자의 Chlortetracycline(CTC) 형광 분석

연구 1과 2에서 정자의 생존상태는 Hoechst bis-benzimide 33258을 이용해 평가하였다. 정자 샘플은 2분간 실온에서 배양한 후 phosphate-buffered saline (PBS)내에 2%의 polyvinyl-pyrrolidone을 첨가한 용액 4ml를 첨가하여 5분간 900g에서 원심분리 하였다. 원심분리 이후 부유액을 제거하고 펠렛은 CTC처리전 재부유시켰다.

정자의 기능은 DasGupta 등(1993)에 의한 CTC 형광분석법을 이용하였다. 정자는 0.5 M Tris-HCl(pH 7.4)내에 8 μ l의 12.5% w/v paraformaldehyde를 첨가하여 고정하였다. 슬라이드 위에 정자를 고정한 후, 0.22 M 1,4-diazabicyclo (2.2.2) octane을 용해한 액 한방울을 떨어뜨려 형광이 소멸되는 것을 지연시켰다.

정자의 평가는 위상차와 형광렌즈가 부착된 현미경을 이용하였으며, 자외선을 이용하여 정자의 생존 여부를 평가하였다. 각각의 샘플에서 200개의 살아있는 정자를 평가하였으며, CTC형광분석 결과 세 가지 형태로 분류하였다; 수정능력을 획득

하지 못하고 침체가 정자두부에 남아있어 형광을 발하는 경우를 F로, 수정능력을 획득하고 침체가 남아있어 형광의 밴드가 보이는 경우를 B로, 수정능력을 획득하고 침체반응이 일어나 형광이 없는 상태를 AR로 평가하였다.

【연구 4】 정자의 zona-binding능력의 평가

투명대에 부착되는 정자의 activity는 salt-stored homologous 투명대에 접착되는 정도로 평가하였다. 체외성숙시킨 난자는 0.1% hyaluronidase로 처리하여 난구세포를 제거한 후 1% dextran이 함유된 1.5M magnesium chloride를 가지고 평형시켜 사용시까지 4℃에서 보관하였다. 그 후 난자는 실험 전 1시간동안 FCS가 함유된 체외수정용 배양액내에서 세척하여 재차 평형시킨 후, 연구 1에서 사용된 glycosidase 유도물질을 각각 첨가하여 체외수정 후 현미경을 통하여 투명대에 접착한 정자의 수를 측정하였다.

Ⅲ. 결 과

본 연구는 돼지 동결-융해 정자의 배양에 의한 체외수정능력과 glycosidase activity에 대하여 검토하였다. 본 실험에 이용된 4종류의 p-nitrophenyl 유도물질(α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, β -D-galactosidase 및 β -GlcNAc'ase)로부터 p-nitrophenyl

을 유리하는 원리에 의해 glycosidase activity를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 동결-융해 정자를 2시간 배양한 경우 배양하지 않은 정자에 비해 모든 처리구에서 높은 glycosidase activity를 나타냈지만 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 그러나 α -L-fucosidase, α -D-mannosidase 및 β -D-galactosidase에 비해 β -GlcNAc'ase는 최소한 2배 이상의 activity를 나타냈다.

한편, 동결-융해 정자를 체외수정용 배양액 내에서 4, 8, 12, 16, 20 및 24시간 배양한 후 glycosidase activity를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 정자의 배양시간에 관계없이 GlcNAc'ase의 처리시 다른 p-nitrophenyl 유도물질 처리시보다 최소한 2배 이상 높은 activity를 나타냈다. 그러나 정자의 배양시간에 따른 유의차는 인정되지 않았다.

한편 p-nitrophenyl 유도물질이 돼지 동결-융해 정자의 침체반응에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 각각의 유도물질은 정자의 침체반응에 영향을 미치지 않았으며, 이때 정자의 배양시간에 따른 영향도 인정되지 않았다. 그러나 α -D-mannosidase 처리한 정자를 2시간 배양한 경우, 대조구에 비해 유의적으로 높은 침체 반응율을 나타냈다 ($P < 0.05$).

또한 p-nitrophenyl 유도물질이 돼지 동결-융해 정자의 생존성에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 그 결과, Fig. 4에 나타낸 바와 같이 각각의 유

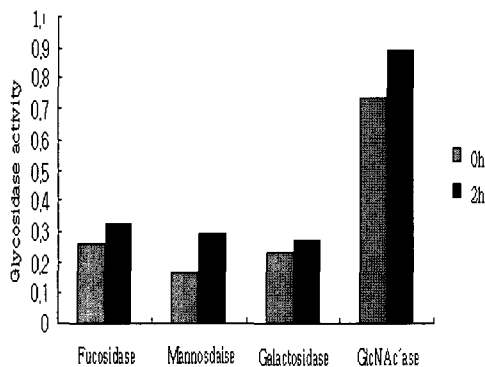


Fig. 1. Activity of glycosidase in frozen-thawed spermatozoa incubated for 0 (white bars) and 2 h (black bars).

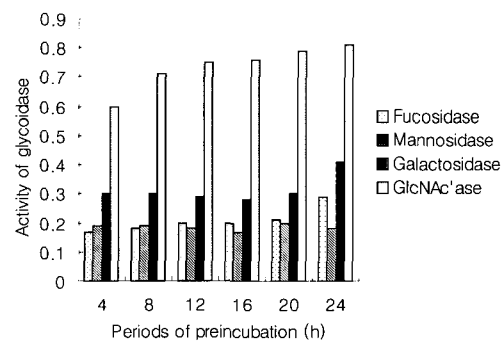


Fig. 2. Changes of glycosidase activity on the spermatozoa incubated with different periods.

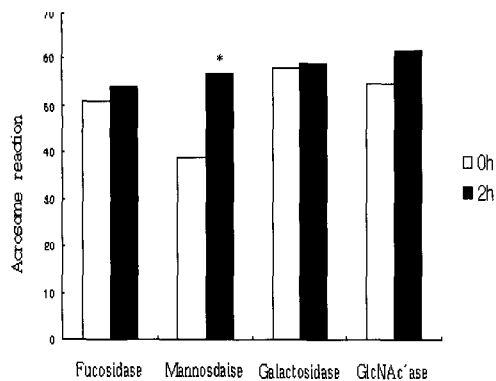


Fig. 3. Effects of glycosidase on acrosome reaction *in vitro* in frozen-thawed spermatozoa with and without incubation. (* $P < 0.05$)

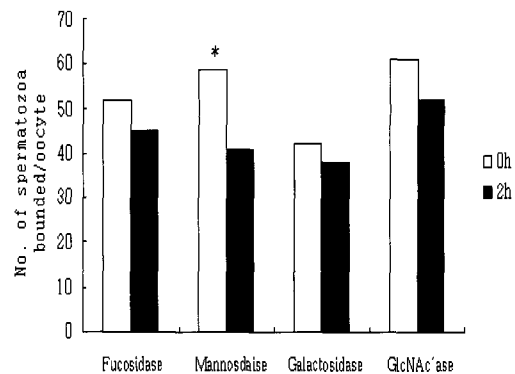


Fig. 5. Effects of glycosidases on zona pellucida binding of spermatozoa with and without incubation in the pig. (* $P < 0.05$)

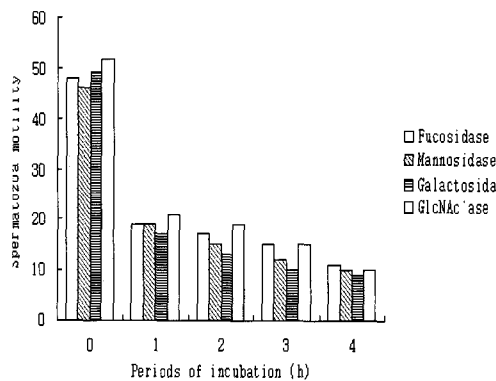


Fig. 4. Effects of glycosidases on *in vitro* motility of spermatozoa incubated with different periods.

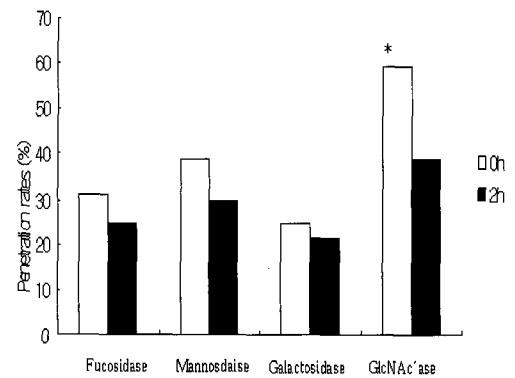


Fig. 6. Effects of glycosidases on *in vitro* penetration by spermatozoa with and without incubation in the pig. (* $P < 0.05$)

도물질과 관계없이 동결정자의 용해 즉시의 경우에 1, 2, 3 및 4시간 배양한 경우보다 생존율이 높았으며, 배양시간이 길어짐에 따라 생존율이 낮아지는 일반적인 경향을 보였다. 한편 동결-용해정자의 각 배양시간에 따른 생존성에 대해서 각각의 유도물질간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

다음으로, 동결-용해 정자를 체외수정용 배양액 내에서 p-nitrophenyl유도물질로 처리한 후 난자의 투명대내에 접착하는 정자수를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 β -GlcNAc'ase로 처리했을 때 가장 많은 정자가 부착되었다. 이 때 정자를 2시간 동안 배양한 경우 대조구에 비해 모든

처리구에서 난자의 투명대에 접착한 정자수가 감소하였으며, α -D-mannosidase로 처리한 경우 유의적인 차이가 인정되었다 ($P < 0.05$).

마지막으로 동결-용해 정자를 2시간 배양 또는 배양하지 않는 경우 p-nitrophenyl 유도 물질 처리 후 정자의 침입상황을 검토하였다. 그 결과, Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 α -L-fucosidase, α -D-mannosidase 및 β -D-galactosidase에 비해 β -GlcNAc'ase의 처리시 정자의 배양 유무에 관계 없이 높은 정자 침입율을 나타냈다. 또한, 모든 처리구에서 2시간 배양시 대조구에 비해 정자의 난자내 침입율이 낮아지는 것으로 나타났으며, β -GlcNAc'ase처리시 유의적인 차이가 인정되었다 ($P < 0.05$).

IV. 고 찰

본 연구는 체외에서 돼지 동결-융해 정자의 수정능력획득과 수정시 glycosidase activity에 있어서 정자의 전배양과 p-nitrophenyl 유도물질의 영향을 검토하였다. 그 결과 α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, β -D-galactosidase 및 β -GlcNAc'ase와 같은 glycosidase는 돼지의 정자내에 존재하고 있는 것으로 나타났다. 특히 β -GlcNAc'ase의 activity는 다른 glycosidase의 처리시보다 2배 이상 높게 나타났으며, 이들 모든 유도물질의 activity는 2시간 배양된 정자에서 더 높게 측정되었지만 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 또한 p-nitrophenyl로 정자를 처리한 후 4, 8, 12, 16, 20 및 24시간 배양 후 glycosidase activity를 측정한 결과 β -GlcNAc'ase와 같은 glycosidase가 다른 처리구에 비해 정자의 배양시간에 관계 없이 최소 2배 이상의 activity를 나타냈다. 그러나 동일 glycosidase 사이에서 activity는 정자의 배양시간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

첨체의 β -GlcNAc'ase는 투명대의 효과적인 통과를 위해 필요한 것으로 알려져 있지만, 투명대의 glycoprotein기질과의 상호작용을 위한 정자 β 1,4-galactosyl-transferase(GalTase)의 역할에 대해서는 분명히 밝혀지지 않고 있다. 첨체의 β -GlcNAc'ase는 투명대에 존재하는 N-acetylglucosamine을 제거 또는 보호함으로써 투명대 침입에 영향을 미치며, 첨체반응을 일으킨 정자에 있어서 GalTase와 잠재적인 상호작용을 하여 투명대내 정자침입을 방해하는 것으로 알려져 있다. 정자는 원형질막내의 GalTase를 방출하기 보다는 첨체반응이 일어나는 동안 GalTase를 유지함으로써 이들 GalTase가 첨체반응이 일어나는 동안이나 또는 첨체반응 이후 어떠한 기능을 제공할 것으로 추측하였다(Lopez와 Shur, 1987). GalTase는 초기 결합시에는 ZP3에 결합하고 첨체반응의 유기를 일으키며(Macek 등, 1991), 첨체반응이 일어나는 동안 정자 표면에 대한 GalTase의 재분배에 의해 투명대내에서 ZP3의 oligosaccharides와 복합되어 남아있다. 그러나 초기 결합은 일시적인 결합으로 친화력도 낮기 때문

에 수용성 zona glycoproteins를 이용하거나(Miller 등, 1992), 투명대에 결합하는 첨체반응이 유기된 정자(Wassarman, 1988)에 의해서는 분석하기 어렵다. 그러므로 첨체물질들은 투명대 표면으로부터 정자를 방출하지 않고 받아들여지게 되며, 결과적으로 첨체반응을 완전히 일으킨 정자가 정자두부의 측면으로 투명대에 접합하여, 이미 확인된 정자의 물질을 이용해 또 다른 zona glycoproteins에 2차 결합을 시작한다(Jone 등, 1988; Lathrop 등, 1990). 이 시기에 투명대 침입이 시작되며, 첨체 β -GlcNAc'ase는 남은 N-acetylglucosamine에 노출되어 재결합되는 것으로부터 GalTase를 보호함으로써 정자의 투명대 통과를 방해하게 된다.

본 연구에서 정자의 첨체반응은 2시간 배양시 배양하지 않은 경우에 비해 약간 높은 유기율을 나타냈으며 α -D-mannosidase로 처리한 경우에만 유의적인 차이가 인정되었다. 그러나 서로 다른 p-nitrophenyl 유도물질의 처리에 의한 차이는 인정되지 않았다. 한편 이들 처리구를 0, 1, 2, 3 및 4시간 배양한 정자의 생존성은 일반적으로 정자의 배양시간이 연장됨에 따라 낮아지는 경향을 나타냈다. 그러나 각각의 정자 배양시간에서 서로 다른 p-nitrophenyl 유도물질의 처리에 의한 정자의 생존성에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

첨체내의 β -GlcNAc'ase는 마지막 남아있는 N-acetylglucosamine을 제거하기 위하여 정자가 투명대를 통과하는 동안 촉매기능을 하며, 투명대결합 glycoproteins으로부터 GalTase를 차단하기 때문에 N-acetylglucosamine을 보호하기 위한 lectin과 같은 기능을 한다(Goldstein 등, 1980). Lysosomal-type의 효소와 같은 acrosomal β -GlcNAc'ase는 산성 pH에 높은 activity를 갖고 있지만 p-nitrophenyl 물질을 이용해 분석했을 때 pH 7.4에서 매우 낮은 활성도를 나타낸다(Farooqui와 Srivastava, 1980; Majumber와 Turkington, 1974). 따라서 투명대 침입에 대한 분석이 중성 pH에서 수행되었기 때문에 β -GlcNAc'ase는 남아있는 마지막 N-acetylglucosamine을 보호하고 단순히 결합도 이루어질 수 있었다. 그러나 첨체는 산성이기 때문에 첨체의 주변은 촉매의 활성에 의해 충분히 산성이 되며,

zona glycoproteins으로부터 남아있는 마지막 N-acetylglucosamine을 충분히 제거되었다. 만약, β -GlcNAc'ase의 일부가 다른 침체단백질과 같이 침체반응을 일으킨 정자내에 남아있다면(Kopency와 Flechon, 1981) 그것은 투명대내의 정자 침입시 촉매작용을 할 것이며, 남아있는 N-acetylglucosamine의 영향을 받아 일어나는 작용으로부터 GalTase를 보호할 것으로 추측된다.

한편, acrosin과 같이 침체내 β -GlcNAc'ase의 activity는 투명대의 용해에 기여하지만, 단지 β -GlcNAc'ase만 가지고 투명대를 처리한 경우 투명대에 영향을 미치지 않았다(Farooqui와 Srivastava, 1980). 이것은 투명대가 여러 개의 다른 최종 monosaccharides를 가지고 있으므로 β -GlcNAc'ase를 포함한 다른 여러 glycosidase가 존재하는 것으로 생각되어졌다(Mori 등, 1991). 그 중에서도, 특히 β -GlcNAc'ase는 다른 glycosidases보다 활성도가 더 높은 것으로 보고되었다(Miller 등, 1993).

본 연구에서 난자의 투명대내에 부착한 정자의 수와 난자내 침입율은 β -GlcNAc'ase의 처리시 높게 나타났으나 서로 다른 p-nitrophenyl 유도물질의 처리에 관계 없이 정자의 배양에 의해 낮아지는 결과를 나타냈다.

침체내에서 높은 농도의 β -GlcNAc'ase와 투명대는 정자 receptor의 activity를 위해 남아있는 glycoproteins을 동시에 내포하지는 않는다(Miller 등, 1992). 또한 최종 N-acetylglucosamine을 함유하고 있는 난자의 glycoproteins는 다른 동물종에서도 정자의 결합에 매우 중요하다. Xenopus에서 우렁쟁이까지의 모든 동물에서 β -GlcNAc'ase는 난자내에 있는 비활성 sperm receptor와 난자의 활성화에 의해 방출되기 때문에 다정자침입을 억제하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Lambert, 1989; Prody 등, 1985).

일반적으로 glycosidases는 endocytic/lysosomal 경로의 glycoconjugates에서 변형된 oligosaccharides인 세포간효소로 생각되어져 왔다. 그러나, Liotta 등(1986)은 glycosidases가 세포외에서 분비될 수 있으며, protease활성과 연계되어 종양세포 전이에 매우 큰 효과를 가지고 있다고 보고했다.

따라서 침체내 β -GlcNAc'ase는 정자와 난자의 결합초기에 방출되며, 난자막내의 정자 유착분자에 대해 결합부분을 제거함으로써 정자의 투명대 침입을 촉진한다고 보여진다.

정자와 난자의 결합초기에 ZP3는 정자의 침체내에 존재하는 G-protein을 직접 또는 간접적으로 활성화시키는 것으로 알려진 GalTase와 같은 receptor를 결합하는 것으로 알려져 있다(Endo 등, 1989; Macek 등, 1991). 침체반응의 결과로 GalTase를 내포하고 있는 원형질막이 소실되지만, GalTase가 정자두부의 측면으로 이동하므로써 침체반응을 일으킨 정자에서 그대로 존재하기도 한다(Lopez와 Shur, 1987).

최근의 연구에서도 GalTase가 침체반응이 일어나는 동안에 왜 작용하는지, 침체반응이 일어난 정자내에서 어떤 기능을 하고 있는지에 대해 확실히 밝히지 못하고 있다. 그러나 GalTase는 정자의 침체반응 후 수용성인 투명대의 glycoproteins에 더 이상 결합하지 않으며, 비투명대 glycoprotein이 계속해서 결합함으로써 침체반응시 기질의 친화성면에서 그 결과는 서로 다르게 나타나고 있다(Miller 등, 1993). 그것은 ZP3 oligosaccharides에 결합하는 GalTase가 침체반응이 일어나는 동안에 정자와 투명대와의 결합을 유지시키며, 침체반응이 일어난 정자가 투명대와의 초기결합을 안정적으로 도와주는 것으로 생각할 수 있다. 또 다른 면에서 생각해 보면, 완전히 침체반응을 일으킨 정자는 ZP2라는 또다른 zona glycoprotein에 의해 투명대에 결합하는 것으로 생각된다(Bleil 등, 1988). 결과적으로 침체반응을 일으킨 정자는 투명대를 통과하며, 침체로부터 방출된 효소에 의존하는 것으로 추측된다. 그러나 protease acrosin 과 같은 trypsin을 제외하고는 정자가 투명대를 통과하는 동안 침체효소의 기능에 대한 이해는 아직도 부족하다(Anakwe 등, 1991).

단백질가수분해의 활성을 위해 acrosin의 첨가시, 침체는 정자 표면의 receptor와 투명대와의 안정적인 분자결합을 방해하는 효소의 작용이 일어난다. 이와 관련하여 침체반응을 일으킨 정자에서 GalTase는 투명대의 glycoproteins에서 방출된 N-

acetylglucosamine에 의해 정자의 투명대 침입을 방해한다. 그러므로 침체는 효소를 방출하며, 이 효소는 GlcTase가 투명대의 glycoprotein에 결합하는 것을 방해한다. 따라서 Mill 등(1992)은 β -GlcNAc'ase가 투명대에서 GalTase가 결합하는 부분을 제거할 수 있는가에 대해 연구하였으며, 또 다른 glycosidase가 침체반응이 일어나는 동안 방출되며 정자의 투명대 통과에 어떠한 역할을 하리라고 생각하였다. Miller 등(1993)은 이와 관련된 연구에서 β -GlcNAc'ase가 정자에 존재하며, 이들의 활성도는 다른 glycosidase보다 최소한 20배 이상 높다고 보고하였다. 이 효소는 등위효소(isozymic)의 또다른 β -hexosaminidase B로 밝혀졌으며, 생화학적 또는 간접형광분석법에 의해 침체에 존재하는 것으로 확인되었다. 정자가 투명대를 통과하는 동안 침체내 β -GlcNAc'ase의 기능은 PUGNAC라고 하는 β -N-acetylgluco-saminidase 활성에 대한 특수억제제의 첨가에 의해 평가되었다. PUGNAC는 정자활력의 변화 또는 투명대의 접촉에 의한 침체반응 없이 정자의 투명대 통과를 억제한다. 특히 마우스 정자의 침체는 높은 농도의 β -GlcNAc'ase를 함유하고 있으며 정자의 투명대 통과를 위해 필요한 것으로 알려져 있다. 그러나 돼지의 경우, 동결정액을 이용한 체외수정시 정자침입율이 낮고 다정자침입율이 높은 특성이 있으므로 그 문제점을 해결할 수 있는 연구가 요구된다.

V. 요약

본 연구는 돼지 동결-융해 정자의 배양에 의한 체외수정능력과 glycosidase activity를 평가하기 위하여 chlortetracycline fluorescence분석법을 이용하여, glycosidase가 체외수정능력과 정자침입에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 또한 돼지난자의 투명대내에서 발견된 당잔기에 대한 정자의 glycosidase 특이성을 확인하기 위하여 α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, β -D-galactosidase 및 N-acetyl- β -D-glucosaminidase (β -GlcNAc'ase)의 activity를 분석하였다. 그 결과 glycosidase activity는 동결정자의 융해 후 배양하지 않았을 때보다 2시간 배양했

을 때 더 높게 나타났다. β -GlcNAc'ase의 activity는 정자 배양 유무에 관계없이 다른 glycosidase 처리시보다 최소한 2배 이상 높게 나타났다. 또한 침체반응이 유기된 정자의 비율은 glycosidase (α -D-mannosidase; $P<0.05$)에 의해 영향을 받았으며 정자를 배양하지 않은 경우보다는 배양된 정자에서 높게 나타났다. 그러나 배양시간에 따른 정자의 생존성에 대해 glycosidase의 종류에 따른 유의차는 인정되지 않았다. 한편 투명대내 정자의 접촉과 침입에 대한 또 다른 실험에서, 서로 다른 glycosidase가 첨가된 배양액내에서 수정된 정자가 배양 시간이 길어짐에 따라 정자의 침입율은 낮아졌다 (β -GlcNAc'ase; $P<0.05$). 투명대내의 정자접착정도는 glycosidase의 첨가시에 무첨가시보다 접착정도가 더 높았으며, 가장 높은 접착율은 β -GlcNAc'ase 첨가시 나타났다. 또한 모든 glycosidase 처리시 2시간 배양한 정자보다는 배양하지 않은 정자에서 투명대에 대한 접착정도가 높게 나타났으며, α -D-mannosidase의 처리시 유의적인 차이를 보였다 ($P<0.05$). 본 연구의 결과, β -GlcNAc'ase가 주로 돼지정자의 원형질막내에 존재하는 것으로 추측되며, 배양된 정자에 의한 투명대 접착정도와 침입율이 낮았음에도 불구하고 glycosidase activity가 증가하는 것으로 나타났다.

VI. 인용문헌

1. Anakwe, O. O., Sharma, S., Hardy, D. M. and Gerton, G. L. 1991. Guinea pig proacrosin is synthesized principally by round spermatids and contains O-linked as well as N-linked oligosaccharide side chains. *Mol. Reprod. Dev.* 29:172-179.
2. Bleil, J. D., Greve, J. M. and Wassarman, P. M. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida, role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* 128:376-385.
3. DasGupta, S., Mills, C. L. and Fraser, L. R. 1993. Ca^{2+} -related changes in the capacitation

- state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* 99:135-143.
4. Endo, Y., Lee, M. A. and Kopf, G. S. 1988. Characterization of an islet-activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Dev. Biol.* 129:12-24.
 5. Farooqui, A. and Srivastava, P. N. 1980. Isolation of β -N-acetylhexo-saminidase from rabbit semen and its role in fertilization. *Biochem. J.* 191:827-834.
 6. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsingy, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin. *Nature.* 285:66.
 7. Jones, R., Brown, C. R. and Lancaster, R. T. 1988. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development.* 102:781-792.
 8. Kopeny, V. and Flechon, J. E. 1981. Fate of acrosomal glycoproteins during the acrosome reaction and fertilization, a light and electron microscope autoradiographic study. *Biol. Reprod.* 24:201-216.
 9. Lambert, C. C. 1989. Ascidian eggs release glycosidase activity which aid in the block against polyspermy. *Development.* 105:415-420.
 10. Lathrop, W. F., Carmichael, E. P., Myles, D. G. and Primakoff, P. 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J. Cell Biol.* 111:2939-2949.
 11. Liotta, L. A., Rao, C. N. and Wewer, U. M. 1986. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 55:1037-1057.
 12. Lopez, L. and Shur, B. D. 1987. Redistribution of mouse sperm galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 105:1663-1670.
 13. Macek, M. B., Lopez, L. C. and Shur, B. D. 1991. Aggregation of β -1,4-galactosyltransferase of mouse sperm induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 147:440-444.
 14. Majumber, G. C. and Turkington, R.W. 1974. Acrosomal and lysosomal isoenzymes of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in rat testis. *Biochemistry.* 13:2857-2864.
 15. Miller D. J., Macek M. B. and Shur B. D. 1992. Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature.* 357:589-593.
 16. Miller, D. J., Gong, X. and Shur, B. D. 1993. Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development.* 118:1279-1289.
 17. Mori, E., Takasaki, S., Hedrick, J. L., Wardrip, N. J., Mori, T. and Kobata, A. 1991. Neutral oligosaccharide structures linked to asparagines of porcine zona pellucida glycoproteins. *Biochemistry.* 30:2078-2087.
 18. Prody, G. A., Greve, L. C. and Hedrick, J. L. 1985. Purification and characterization of an N-acetyl- β -D-glucosaminidase from cortical granules of *Xenopus laevis* eggs. *J. Exp. Zool.* 235: 335-340.
 19. Wassarman, P. M. 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57:415-442.
- (접수일자: 2003. 4. 26. / 채택일자: 2003. 5. 20.)