大韓不妊學會雜誌: 第17卷 第2號 1990
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 17, No. 2, 1990, 11.

정장내의 Antifertilizing factor의 분리 및 정제

경희대학교 의과대학 산부인과학교실 불임 크리닉

김수원 · 백청순 · 김재명 · 서병희 · 이재현

Partial Purification of Antifertilizing Factor from Seminal Plasma

S.W. Kim, M.S., C.S. Baik, M.S., J.M. Kim, M.S., B.H. Suh, M.D. and J.H. Lee, M.D.

Infertility Clinic, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Kyung Hee University

=Abstract=

Early studies demonstrated that seminal plasma has a factor which inhibits fertilizing ability in a reversible manner.

The factor can be precipitated by centrifugation at 104000g for 18hr. The precipitate was applied to a CM cellulose column and eluted with high salt concentration. This fraction possessed antifertilizing activity was applied to a Sephacryl S-200 column according to a modification of the method of Reddy et al.

Using such inhibition of in vitro fertilization ability as an assay, we have carried our experiments to purified the factor. When the factor was added to IVF medium, 70-80% of fertilization was inhibited.

서 론

정자는 남성생식기도관으로부터 사출될 당시에는 난자와 수정할 수 없으나 여성생식기도에서 어느 정도 시간이 경과하면 수정능을 획득하게 된다(Austein, 1951 ; Chang, 1951). 이 기능적 형질전환을 야기하는 정자의 변화를 '수정능 획득(capacitation)'이라고 한다. 이어서 정자는 난자와 연관된 성분과 상호작용하여 첨체반응(acrosomal reaction)을 일으키고 투명대(zona pellucida)를 통과하여 난자와 수정한다(Yanagimachi, 1988).

정장 속에는 여러 물질이 포함되어 있는데, 그 중에서 정자의 수정능을 방해하는 고분자의 물질이 초원심분리 방법에 의해 분리되었다(Bedford and Chang, 1962). 이러한 고분자물질은 생화학적 성질이 아직은 명확히 규명되어 있지는 않지만 대략 200,000 daltons 정도의 분자량을 가진 당단백질로서 열과 동결건조에 안정한 것으로 알려져 있다(Hunter and Nornes, 1969). 기능적으로는 토끼, 생쥐 및 햄스터 등의 정자에서 수정능 획득을 방해하는 것으로 나타나 'decapacitation factor'라고도 불리고 있다(Pinsker and Williams, 1982 ; Reddy et al., 1979). 또한 이 물질은 정자 proteinase, acrosin (Zeneveld et al., 1971) 및 vesicle(Davis and Niwa, 1974)의 억제제로서도 생각되고 있다. 최근에 들어서는 Reddy등(1979)의 방법에 의해 분리되고 있으며, 생쥐 인공수정실험을 통해 그 활성여부를 조사하고 있다.

이에 좀 더 순도가 높은 antifertilizing factor(AF)를 분리하기 위한 실험을 시행하였으며 생쥐 인공수정 이외에도 CTC assay와 hamster penetration test 을 병행 시행하여 그 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

*본 논문은 1990년 10월 19일 대한산부인과 제66차 추계학술대회에서 발표하였음.

*본 논문은 1990년 경희대학교 의과대학교수 연구비로 이루어졌음.

1. 정장으로 부터의 고분자 물질 획득

Reddy 등(1979)의 방법에 의해 정장으로부터 항수정능을 가진 crude pellet을 얻는다. 정액으로부터 정자를 제거한 후 800 ×g로 20분간 원심분리하고 다시 104000 ×g로 18시간 초원심분리하여(Beckman L265B) pellet를 얻는다. 그리고 두번정도 세척하여 멸균된 물로 투석하고 동결건조하여 -20℃에서 보관한다.

2. 생물학적 활성측정

1) 생쥐 체외수정

생후 3개월된 생쥐(ICR strain)를 경추이탈로 도살한 후 부정소 미부를 적출하여 배양액(Whittingham's medium : BSA 20mg/ml)에 넣어 수정능 획득을 유도한다. 이 배양액에 AF 부척을 넣고 37℃에서 20분간 방치한다. 난자의 채취는 PMSG 5IU를 주사한 뒤 48시간 후에 HCG를 5IU를 복강내에 주사하여 과배란을 유도한 뒤 난관으로부터 1ml의 배양액이 담겨진 petri dish에서 실시했다. 여기에 앞의 정자를 넣고 5% CO_2상태에서 4시간동안 37℃에서 배양한 후 수정율을 본다.

2) 햄스터 난자 침투 분석

Yanagimachi의 방법(1988)에 따라 8-12주령 사이의 Golden hamster(Mesocricetus auratus)의 과배란을 유도하여 난자를 채취한 다음 trypsin(1mg/ml)를 이용 투명대를 제거한 뒤 정자의 수정률을 관찰하였다.

3) CTC assay

정자를 일정한 시간 capacitation medium에 넣어 둔 뒤 37℃에서 따뜻하게 데운 slide glass 위에 5㎕ 놓은 뒤 130mM NaCl, 20mM Tris, 5mM cystein 용액, pH 7.7에 들어있는 500㎍M chlorotetracycline hydrogen-chloride 5㎕를 넣어준 다음 1M Tris에 녹아있는 0.06% glutaldelyde 0.05㎕를 가하여 형광상태를 고정시킨다. 이때 이 side는 무작위로 400배 형광현미경(Nikon Optic photo epifluorescence microscope)하에서 50마리의 정자 중에서 다른 종류의 CTC 형태를 관찰하여 그 결과를 지표로 사용된다(Michael et al., 1987).

Table 1. Effect of antifertilizing factor on the in vitro fertilization of mouse

	Total no of oocytes	No of 2 cell cnbryos	No of pene-tration	mean % fettili-zation
Control	44	36	7	99±0.16
Af-1	22	1	6	31±0.045
Af-4	32	0	10	32±0.61

결 과

AF를 포함하고 있는 분획은 원심분리 및 초원심분리 방법으로 준비하였으며 이 과정에 있는 단백질의 양상은 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 하였다(Fig. 1). 이때 mouse IVF를 이용하여 AF의 생물학적 활성을 검증한 결과 대조군에 비해 70%이상 수정을 방해하였다(Table 1).

초원심분리 후의 활성을 시킨 분획을 0.01M sodium citrate 완충용액(pH 6.2)으로 투석한 후 같은 완충용액으로 평형화시킨 이온교환 column인 CM-cellulose column에 통과시켰다. 이 column을 sodium chloride 0-0.5M 농도로 elution하고 각각의 농도 분획을 10% SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 2). Table 2의 결과에 의하면 peak 2(fraction 22-30)만이 AF활성을 가졌으며 이것은 0.2M NaCl로 추출된 분획이었다.

수정과정 중의 수정능 획득에 미치는 영향을 알기 위해 CTC assay를 시행하였는데, CTC assay는 두개의 특이한 형광현상을 나타낸다. 수정능 획득이 안된 경우는 정자의 머리 앞 부분 일부와 목 주변에 강한 형광을 나타내고 수

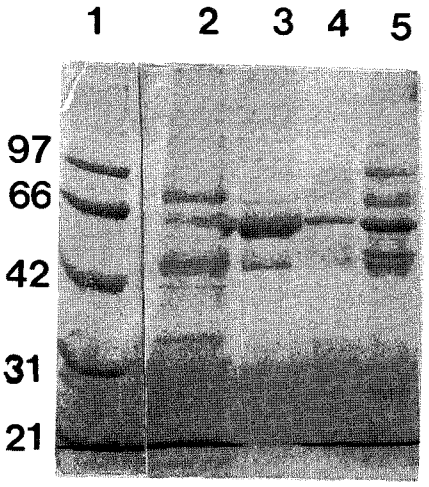

Fig. 1. 10% SDS-PAGE. 1 : standard marker 97 kd ; Phosphorylase b, 66 ; BSA, 42 ; Ovalbumin, 31 ; Carbonic anhydrase, 21 : Trypsin inhibitor. 2 : AF-1. 3 : AF-2. 4 : AF-3. : AF-4.

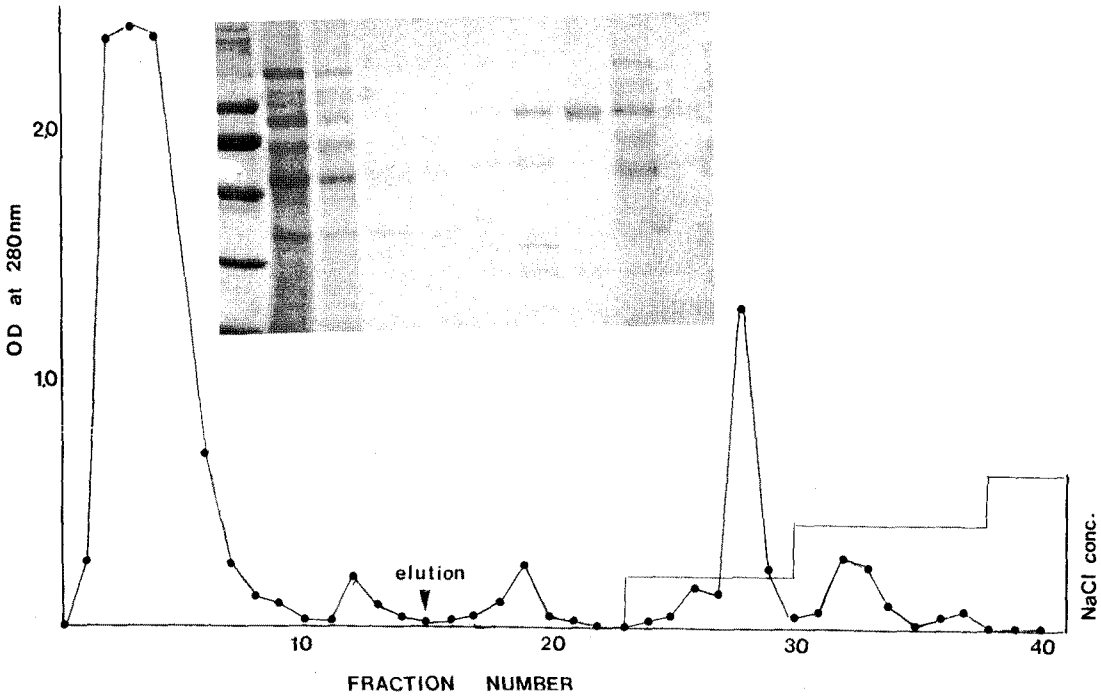

Fig. 2. Cation exchange chromatography using carboxylmethyl cellulose equilibrated in 0.01M sodium cirtate buffer, pH 6.2. The column (2.5×15cm) was eluted stepwise at a rate of 20ml/h, first with the cirtate buffer and subsequently with cirtate buffer containing 0.1, 0.2, 0.3, 0.5M NaCl. Fractions 15-21 (peak 1), 25-30 (peak 2), 31-35 (peak 3), 36-38 (peak 4) were pooled and 10% SDS-PAGE.

Table 2. Effect of CM-cellulose eluted peaks on the in vitro fertilization of capacitated mouse spermatozoa

Incubation	Total oocyte	No of 2 cell embryo	mean % fertilization
Control 1	44	38	86.5
Peak 1	43	32	78.0
Peak 2	52	15	28.8
Peak 3	27	23	85.2
Peak 4	26	19	73.1

정능을 획득한 경우에는 정자 두부의 주변에 강한 형광을 나타낸다(Fig. 3). 이것을 이용하여 CM cellulose column의 분획득을 실험한 결과, 수정능 획득이 일어날 충분한 시간인 3시간 후에도 peak 2의 경우는 대조군에 비해 60%이상 수정능 획득이 억제되었다. 또한 이것은 같이 시행한 hamster penetration assay 결과와도 일치하였다(Table 2).

활성을 가진 분획을 모아 Sephacryl S-200 culumn에 통과시켰으며(Fig. 4), 이때의 분획들을 생쥐 체외수정 실험을 통하여 활성도를 살펴본 결과, 이 물질이 정자의 수정능을 방해하는 antifertilizing factor(AF)라는 것을 확인할 수 있었다.

수정율이 50%정도 줄어드는 농도를 I_{50}이라 표기하고 각 chromatography를 실시한 결과, 약 60배 정도의 활성도 증가와 순도를 나타내었다.

고 찰

위의 결과들로 인간 정장내에 수정을 방해하는 고분자의 물질이 존재한다는 것을 알 수 있었다.

정장내에는 수정과정에 관여하는 것으로 생각되어지는 많은 단백질들이 존재한다고 알려져 있으며(Davis, 1973 ; Davis and Niwa, 1974) 이 때문에 체외수정 프로그램과 인공수정시에 정장을 제거하는 과정이 행해져 왔다.

이 단백질은 분자량이 대략 200,000 daltons

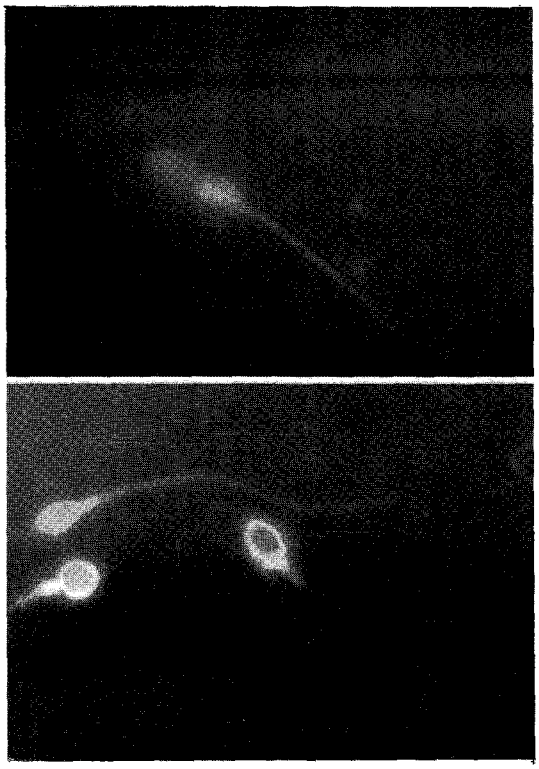

Fig. 3. Epifluorescent photomicrograph of human spermatozoa expose to CTC. 1 ; Sample incubated for 1 hour under capacitaion conditions. 2 : sample incubated for 10 hour under capacitation conditions.

정도로 알려져 있는데 chromatography에서 나타난 peak를 SDS-PAGE 한 결과와 AF 활성을 비교한바, 이 단백질은 각각 분자량이 125,000, 72,000 daltons인 두개의 subunit로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다.

Itaska와 Hori(1979)에 의하면 이 단백질은 당을 포함하고 있는 단백질로 이 당은 쉽게 정자의 표면단백질과 결합할 수 있고 세척에 의해 쉽게 제거되지 않는다고 하였다(Reddy et al., 1982) 그러나 사람이 아닌 경우에는 이 당부분이 수정방해 활성에 크게 영향을 끼치지 못하는 것으로 생각되고 있다. 사람의 AF가 정장으로부터 직접적으로 유래했는지는 확실치가 않다. 그러나 적어도 사람이 아닌 경우에는 정관수술한 동물의 사출된 정액속에 존재하는 것으로 알려져 있다.

AF가 초원심 과정뒤의 pellet에서 발견되어지므로 정액내에서 고분자의 carrier와 결합된 상태로 존재하거나 여러개의 단백질이 응집 된 고분자상태로 존재한다고 생각할 수 있다. 일부에서 생각하는 것처럼 정액내에 있는 vesicle이 carrier일 가능성(Davis and Niwa, 1974)은 거의 없는 데 이것은 원심분리한 뒤의 pellet에서는 그 활성을 찾아볼 수 없었기 때문이다.

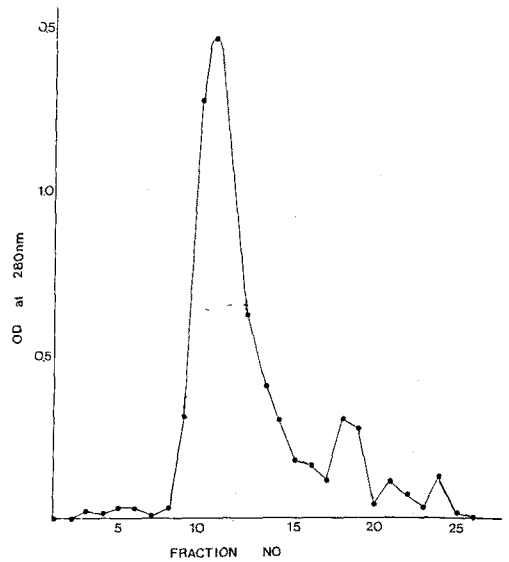

Fig. 4. Sephacryl S-200 gel filtration. The active material (1.2mg) that was obtained after CM-cellulose and was resuspended in 0.5ml of 0.01M sodium acetate buffer, pH 6.5 and applied to 1.1×20cm column containing Sephacryl S-200 equilibrated with the same buffer.

Table 3. The effect of CM-cellulos eluted protein on the CTC assay and Hamster penetration test

	CTC (capacitation)	Hamster penetration rate
Control	42/50	45 (9/20)
Washed frac.	39/50	40 (4/10)
Peak 2	21/50	12 (2/16)

incubation time : 3 hr (CTC assay)
sperm : 5×10^6 cell/ml, motility 90%

Table 4. Purification of antifertilizing factor

Purification	Protein (mg)	I_{50} (mg)	Yield
Seminal plasma (54ml)	1094	12.5	
Ultracentrifuge	220	7.8	1.6
CM cellulose	66	1.2	0.4
Sephacryl S-200	15	0.21	59.5

사람 AF의 생리적작용은 생쥐의 체외수정 실험을 통해 주로 연구되어지고 있는 데 이것은 목적에 따라 사람의 배우체를 사용하는데 어려움이 있기 때문이다. 특별히 AF는 정자의 수정능획득에 영향을 미치는 것으로 생각되어지고 있는데 난자에 AF를 첨가해 수정실험을 한 경우는 수정방해 활성이 나타나지 않고 있다(Reddy et al., 1982). AF는 acrosome reaction을 방해하지는 못하는 것으로 알려져 있으며(Reddy et al., 1982), 수정능을 획득한 정자가 난자를 통과하는 것을 방해하지도 못하는 것으로 알려져 있다(Wolf et al., 1976). 그러나 실험의 결과로 부터 AF가 capacitation에 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다.

CTC assay 결과에서도 보여지는 바와같이 AF가 정자의 수정능획득을 방해하므로써 실제적으로 수정을 방해하는 것으로 나타났다. 따라서 수정능획득을 방해함으로써 acrosome reaction을 억제시킨다.

그러나 수정능획득이 완전히 끝난 상태에서는 acrosome reaction만을 방해하지는 못한다. 첨체반응에 관하여 수정을 방해하는 것으로 알려진 acrosomal stabilizing factor (ASF)와 혼재되어 생각되어 졌으나 본 실험의 결과에서 보는 것처럼 분자량이 ASF는 350,000정도이고 AF는 200,000정도로 차이가 나타났고 수정과정에 관여하는 부분도 다른 것을 알 수 있었다.

결 론

정장내에 수정을 방해하는 것으로 생각되는 단백질이 있다고 보고되어져왔다. 이에 그방법을 변형하여 정장으로부터 그 단백질을 분리하였다. 정장을 104000×g로 초원심분리한 pellet을 CM-cellulose에 걸고 다시 Sephacryl S-200을 이용하여 그 단백질을 분리, 정제였다.

각 과정은 생쥐체외수정실험, 햄스터 난자통과실험, CTC assay를 이용 그 단백질의 활성을 측정하였다.

이 단백질이 Antifertilizing factor라고 생각되어지며 수정을 방해하는 활성을 가진것을 알 수 있었다.

(ope한 pellet을 CM-cellulose에 걸고 다시 Sephacryl S-200을 이용하여 그 단백질을 분리, 정제하였다.

각 과정은 생쥐체외수정실험, 햄스터 난자통과실험과 CTC assay를 이용하여 그 단백질의 활성을 측정하였다.

이 단백질이 antifertilizing factor라고 생각되어지며 수정을 방해하는 활성을 가진것을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

Austein CR : Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951, 4 ; 581.

Bedford JM, Chang MC : Removal of decapitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. *Am J Physiol* 1962, 202 ; 179.

Chang NC : Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature Lond*1951, 168 ; 679.

Davis BK : Isolation and Characterization of rabbit DF. *J Cell Biol* 1973, 59 ; 71.

Davis BK, Niwa K : Inhibition of mammalian fertilization in vitro by membrane vesicle from seminal plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1974, 146 ; 11.

Hunter AG, Nornes HO : Characterization and isolation of a sperm coating antigen from Rabbit seminal plasma with capacitation to block fertilization. *J. Reprod. Fertil* 1969, 20 ; 419.

Itaska O, Hori T : Studies on glycosphingolipids of fresh water bivalve V. The Structure of a novel ceramide octasaccharide containing mannose-6-phosphate found the bivalve, Carbicula. *J Biol* 1979, 85 ; 1469.

Laemmli UK : Cleavage of Structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227 ; 680.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1953, 193 ; 265.

Pinsker MC, Williams WL : Spermatozoa decapitation factor in human seminal plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1982, 29 ; 1076.

Reddy JM, Stack RA, Zneveld LJD : A high molecular weight antifertilizing factor from human seminal plasma. *J. Reprod. Fertil* 1979, 57 ; 437.

Roger BJ, Bentwood BJ : Capacitation, acrosom reaction and fertilization. edit by Zaneveld

LJ, Chatterton RT. New York, Jhon Wiley 1982 P 203.

Wolf DP, Inove M, Dtark RA : Penetration of zona free mouse ova. *Biol Reprod* 1976, 15 ; 213.

Yanagimachi R : Mammalian fertilization. In the physiology of Reproduction. editid by Knobil JU, D Nill. New York, *Raven Press* 1988, p 135.

Zeneveld LJD, Robertson RT, Kessler, N, Williams WL : Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhinbitors. *J Reprod Fertil* 1971, 25 ; 387.