

## 성적 성숙에 따른 생쥐 부정소의 강소형성과 부정소액내 단백질의 전기영동 양상

김문규 · 윤현수 · 최규완 · 윤용달

한양대학교 자연과학대학 생물학과

본 실험은 생쥐에서 부정소액내의 단백질 성분과 조성에 미치는 정소액과 정자의 영향을 알아보기 위하여, 성적 성숙시기에 따라 정소와 부정소의 조직분화 양상을 관찰하였으며, 강소분화 특징에 따라 채취한 부정소액은 전기영동방법(SDS-PAGE)으로 단백질을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

정소와 부정소는 생후 10일군에서 미분화 상태였고, 20일군에서 세정관의 강소는 형성되지 않았으나 부정소는 두부에서 미부에까지 강소가 형성되었으며, 35일군에서는 정소내 세정관의 강소가 형성되었고 정세포는 정자로 분화되었고, 부정소의 상피세포는 principal cell과 clear cell로 분화되었으나 부정소로 유입된 정자는 없었다. 80일군에서는 정소와 부정소가 완전히 분화되었고 부정소로 유입된 많은 정자가 관찰되었다.

그리고 부정소액의 전기영동상에는 혈청내의 성분과 다른 단백질이 모두 28종이 나타났는데, 그중 12종은 부정소액에만 존재하는 부정소 특이단백질(ESP)이었고, 16종은 정소액에도 공통으로 존재하는 단백질(TEP)이었다. 또한 이 단백질들은 성숙시기에 따라 종류가 다르게 나타났으며, 성체에서 나타난 3종의 단백질은 부정소의 부위에 따라 양적인 변화를 나타냈다.

이상의 결과로 보아 부정소액내 단백질의 성분과 조성은 정자를 포함한 정소액의 유입과 부정소 상피세포의 분비 및 흡수의 조절작용에 의하여 변화되는 것으로 사료된다. 따라서 부정소액내의 TEP와 ESP는 부정소 정자의 성숙에 어떤 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

**KEY WORDS:** Lumenation, Epididymal specific protein, Sexual maturation

포유동물의 정소에서 형성된 정자는 부정소를 통과하는 동안 생리, 생화학적 변화를 통하여 성숙하게 된다(Zaneveld, 1982; Voglmayer *et al.*, 1983; Young *et al.*, 1985; Cooper, 1986; Hall and Killian, 1987).

부정소 정자의 성숙과정에서 획득되는 정자의 운동성, 수정시 난자의 투명대 인식 및 부착능력 등을 포함한 정자의 기능들은 정자의 구성성분이 변화하는 것과 밀접한 관련이 있으며(Bedford, 1983; Moore *et al.*, 1983; Cooper, 1986; Primakoff *et al.*, 1987), 그 중 단백질의 변화는

정자의 기능 변화와 직접적인 관련이 있는 것으로 알려지고 있다. 즉 정자의 성숙은 정자의 표면에 부정소액내의 특정한 단백질이 부착됨으로써 정자가 직진운동성을 얻게 되고, 수정시 난자에 부착할 수 있는 능력이 향상되며, 수정전까지 침체가 안정화 되는 것 등으로 알려져 왔다(Acott *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1983; Primakoff *et al.*, 1987). 따라서 정자의 성숙이 이루어지는 환경인 부정소액내 단백질에 대한 분석은 부정소 정자의 성숙 기작을 밝히는 데 있어서 매우 중요한 과제이다.

부정소액은 수출관(efferent duct)을 통하여 정자와 함께 유입되는 정소액의 성분들과, 부정소 상피세포에서 합성되어 분비된 물질들, 그리고

본 연구는 1988년도 문교부 특성화 학술연구조성비로 이루어진 것임.

혈관과 부정소 격벽(blood epididymal barrier)을 통하여 투입되는 혈액의 성분들로 구성된다(Jones and Dott, 1980; Klinefelter *et al.*, 1982; Brooks and Tiver, 1983; Turner *et al.*, 1984). 이들 중 정소액에는 부정소액의 중요한 구성성분으로써 androgen을 비롯한 많은 물질들이 포함되어 있으며, androgen은 부정소 상피세포의 단백질 합성 및 분비 등을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Danzo *et al.*, 1977; Fritz *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1983; Dacheux and Voglmayr, 1983).

그리고 부정소액내 단백질 중에서 혈청이나 정소액에는 존재하지 않는 단백질을 부정소 특이단백질(epididymal specific protein, ESP)이라고 하는데, 사람을 포함한 여러 실험동물에서 ESP는 부정소 상피세포에서 합성되어 분비되며, ESP의 합성과 분비는 androgen-dependent한 것으로 알려져 왔다(Brooks and Higgins, 1980; Hoffman and Killian 1981; Moore, 1981; White *et al.*, 1982; Kohane *et al.*, 1983; Tezon *et al.*, 1985; Arslan *et al.*, 1986; Holland and Orgebin-Crist, 1988).

그런데 부정소는 구조와 형태적인 특징에 따라 두부, 체부 및 미부로 나누어지며, 각 부위에 따라 단백질 합성과 분비 기능이 다른 것으로 보고되었다(Jones, 1978; Hinton *et al.*, 1979; Tomas *et al.*, 1984; Usselman *et al.*, 1985). 또한 부정소 상피세포의 분화된 형태에 따라 합성, 분비되는 단백질들이 다른 것으로 알려져 왔다. 즉, 쥐에서는 principal cell과 clear cell에서 합성되는 단백질의 2차원 전기영동상이 서로 다르며(Shabonowitz and Killian, 1987), 생쥐의 principal cell에서 합성된 단백질은 강소내로 분비되고(Flickinger, 1979, 1981, 1985), clear cell에서 합성된 단백질은 lysosome을 형성한 후 secondary lysosome인 multivesicular body (MVB) 내로 흡수되는 것으로 보아 어떤 효소일 것으로 추측하였다(Dadoune *et al.*, 1985).

한편 생후 20일 전후의 생쥐에서, 부정소관 상피세포의 형태와 부동섬모(stereocilia) 등은 거의 성체 수준으로 분화되고, 성체에 이르는

동안 분화정도에 관계없이 부정소내 androgen은 일정한 농도로 유지되는데 성숙 전까지는 testosterone이, 사춘기 후에는 dihydrotestosterone이 주종을 이루는 것으로 알려져 왔다(Jean-Faucher *et al.*, 1985). 성숙하는 동안 부정소의 분화와 관련하여 몇종의 dehydrogenase와 hydrolase들의 존재부위가 변화하는 것으로 알려져 있으나 (Abou-Haila and Fain-Maurel, 1985), 성숙과정 중 부정소액내 단백질의 변화에 대한 연구는 미진한 상태이다.

따라서 본 연구는 생쥐가 성적으로 성숙하는 동안 정소 및 부정소의 강소형성 과정을 관찰함과 동시에 그 형태적 분화의 특징에 따라 부정소액내 단백질의 전기영동 양상을 분석함으로써 부정소 정자의 성숙기작을 밝히는 데 기초자료를 얻고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 한양대학교 생물학과에서 사육한 생쥐(ICR strain)의 수컷으로 정소와 부정소의 강소형성 그리고 정자의 부정소내 유입시기 등(Abou-Haila and Fain-Maurel, 1985; Jean-Faucher *et al.*, 1985)을 고려하여 생후 10, 20, 35, 80일 된 것을 각각 20-30마리씩 사용하였다.

### 조직 관찰

성적 성숙시기에 따른 조직분화 양상의 관찰은 차후 전자현미경 관찰을 위하여 Luft(1961)의 방법을 변용하였는데, 각 실험군의 생쥐를 경추 파괴로 도살한 후 정소와 부정소를 적출하여 0.1 M cacodylate 완충용액(pH 7.2)내의 2% glutaraldehyde에서 5시간 전고정 하였다. 전고정된 조직은 동일한 완충용액으로 세척한 후, 동일한 완충용액내의 1% osmic acid에서 3시간 후고정하여 ethyl alcohol series를 거쳐 탈수하였다. 탈수된 조직은 propylene oxide로 치환시킨 후 propylene oxide와 Epon 812 혼합액으로 포매

하여 굳혔다. 포매된 조직은 초박편절단기(Ultratome V, LKB)로 glass knife를 사용하여  $1\mu\text{m}$  두께로 자른 후, 1% toluidine blue로 염색하여 정소에서는 세정관내 생식세포의 분화와 강소형성을, 부정소에서는 강소형성과 상피세포의 분화정도를 관찰하였다.

### 전기영동

혈청은 각 실험군의 생쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후 cardiac puncture로 채취하여 얻었고 곧이어 정소와 부정소를 적출하였다. 정소액과 부정소액은 Turner 등(1984)의 방법을 변용하여 채취하였는데, 적출된 정소에서 얻은 seminiferous tubule과, 부정소를 두부(caput, CP), 체부(corpus, CR) 그리고 미부(cauda, CD)로 분리한 조직들을 각각 원심분리기(Beckman, J2-21)로 12,000G에서 1시간동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 획득된 상등액을 동일한 방법으로 재원심분리한 후 분석하기 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 이하에서 보관하였다.

시료내의 단백질 분석은 Laemmli(1970)의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 방법을 변용하여 실시하였는데 running gel은 10% acrylamide를 그리고 stacking gel은 3% acrylamide를 사용하였다. 시료는 lysis buffer로 혈청은 1/8로, 정소액과 부정소액은 각각 1/4로 희석하여 끓인 후  $20\mu\text{l}$ 씩 gel에 올렸으며, 전기영동 전류는 stacking gel에서 20 mA로, running gel에서는 40 mA로 고정하여 4시간동안 전개하였다. 전기영동을 마친 gel은 0.25% Coomassie brilliant blue로 염색한 후 7% acetic acid로 탈색하여 각 시료의 영동상을 분석하였으며, 영동상에 나타난 단백질의 분자량을 측정하기 위하여 표준 단백질은 Sigma사의 myosin(M.W. 205KD), beta-galactosidase(M.W. 116KD), phosphorylase B(M.W. 97.4KD), bovine serum albumin(M.W. 66KD), egg albumin(M.W. 45KD) 그리고 carbonic anhydrase(M.W. 29KD)를 사용하였다.

## 결 과

### 조직분화 관찰

각 실험군의 정소는 세정관내 생식세포의 분화 상태와 강소형성 과정을 관찰하였다. 세정관내의 생식세포는 생후 10일군에서 2차 정모세포, 20일군에서는 일부 정세포로 분화된 것이 관찰되었으며, 35일 이후의 실험군에서는 정자까지 분화되어 있었다. 세정관의 강소는 생후 20일군까지 형성되지 않았으나, 35일 이후의 실험군에서는 완전하게 형성된 강소를 관찰할 수 있었다(Plate I: Figs. 1c, 2c, 3c, 4c).

부정소의 분화는 부정소관의 상피세포 분화와 강소형성 여부를 관찰하였다. 부정소의 강소는 생후 10일군에서 두부에 이미 형성되었고 20일군에서는 미부에도 형성되었으며, 80일군(성체)에 이르는 동안 강소의 크기가 점차로 증가하였다. 정자는 생후 35일군까지 강소내에 존재하지 않았으며, 80일군에서는 두부와 미부의 강소내에 많은 정자를 관찰할 수 있었다. 또한 부정소 상피세포의 부동섬모(stereocilia)는 생후 20일군에서 두부에는 거의 없고 미부에는 이미 형성되어 있었으며, 35일과 80일군의 부정소 상피세포는 두부와 미부에도 부동섬모가 잘 발달하였고 특히 미부의 상피세포는 부동섬모가 발달된 principal cell과 부동섬모가 적고 염색정도가 약한 clear cell로 분화되었다(Plate I: Figs. 2b, 2c, 3b, 3c, 4b, 4c).

### 전기영동 양상

생후 20, 35 그리고 80일군에서 채취한 혈청들의 전기영동상은 성숙정도에 관계없이 동일하게 나타났으며, 세정관의 강소가 형성된 생후 35일군과 80일군에서 채취한 정소액은 서로 동일한 양상을 나타냈다.

부정소관의 강소가 형성된 생후 20, 35 그리고 80일군에서 채취한 부정소액의 전기영동상에는 총 60종의 서로 다른 단백질 band를 관찰할 수 있었으며 이들 단백질을 혈청 및 정소액내의

단백질과 비교하였다. 혈청과 다른 단백질은 모두 28종으로서 그 중 16종은 정소액내에도 공존하는 단백질(testicular and epididymal protein, TEP)로 나타났으며, 12종은 부정소액에만 존재하는 단백질(ESP)로 나타났다(Table 1, Plate I). 각 실험군에서 나타난 TEP와 ESP의 특징들은 다음과 같았다.

생후 20일군에서 나타난 TEP는 15종이고 ESP는 6종 이며(Table 1, Plate II), 이들중 ESP 1종(ID No. 13)은 20일군에서만 나타났

다. 생후 35일군에서 나타난 TEP는 9종이며(Table 1, Plate II), 20일군과 비교하여 TEP 1종(ID No. 22)과 ESP 4종(ID Nos. 1, 3, 6, 27)이 새로 나타났고 ESP 1종(ID No. 13)은 없어졌으며, ESP 1종(ID No. 1)은 35일군에서만 나타났

다. 생후 80일(성체)군에서 나타난 TEP는 15종이고 ESP는 8종으로(Table 1, Plate II), 35일군과 비교하여 ESP 3종(ID Nos. 1, 6, 11)은 없

어졌으며 2종의 ESP(ID Nos. 18, 25)는 80일군에서만 나타났

다. 한편 생후 20일군과 35일군에서 나타난 TEP와 ESP의 양상은 부정소의 각 부위들간에 차이가 없었으나 성체군에서 나타난 TEP 1종(ID No. 22)과 ESP 2종(ID Nos. 24, 25)은 부정소의 두부에서 미부로 갈수록 양적인 증가를 나타냈고 TEP 1종(ID No. 9)은 감소하였다(Plate II).

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 부정소액내 단백질의 성분과 조성은 성적 성숙시기에 따라 변화하며 부정소의 부위에 따라서 다른 것을 알 수 있었다.

## 고 찰

부정소의 성숙과정에서 변화되는 정자내의 단백질들은 성숙 후 정자의 수정능력(fertilizing capability)과 밀접한 관계가 있으므로, 정자의

**Table 1.** Identification and characterization of the proteins in epididymal fluid during sexual maturation in mice

ID No.	M.W. (KD)	Age			Specificity	ID No.	M.W. (KD)	Age			Specificity
		20D	35D	80D				20D	35D	80D	
1	248.9	-	+	-	ESP*	15	60.5	+	+	+	TEP
2	212.5	+	+	+	TEP	16	59.0	+	+	+	TEP
3	203.9	-	+	+	ESP	17	51.5	+	+	+	TEP
4	174.4	+	+	+	TEP	18	50.6	-	-	+	ESP*
5	163.6	+	+	+	TEP	19	49.5	+	+	+	TEP
6	151.7	-	+	-	ESP*	20	44.6	+	+	-	TEP
7	117.9	+	+	+	ESP	21	38.0	+	+	+	TEP
8	114.1	+	+	+	TEP	22	32.5	-	+	+	TEP
9	98.3	+	+	+	TEP	23	31.0	+	+	+	TEP
10	87.2	+	+	+	ESP	24	26.8	+	+	+	ESP
11	71.2	+	+	-	ESP	25	25.3	-	-	+	ESP*
12	69.2	+	+	+	ESP	26	22.6	+	+	+	TEP
13	62.5	+	-	-	ESP*	27	20.4	-	+	+	ESP
14	61.4	+	+	+	TEP	28	19.3	+	+	+	TEP

ID No.: Identification number

+/-: presence/absence

\* : protein detected in only one experimental group of age

ESP: epididymal specific protein

TEP: coexisting protein in testicular and epididymal fluids

성숙기작을 밝히는 데 있어서 연구의 초점이 되어왔다(Orgebin-Crist and Jahad, 1978; Cuasnicu *et al.*, 1984a, 1984b; Moore *et al.*, 1986). 그런데 부정소관 상피세포의 분화, 구조 유지, 흡수 및 분비 기능, 그리고 부정소액내 단백질의 조성은 정소에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(Danzo *et al.*, 1977; Moore, 1981; Brown *et al.*, 1983). 그러므로 성적 성숙이 진행되는 동안 세정관과 부정소관의 강소가 형성됨에 따라 정소액과 정자가 부정소에 유입되는 시기를 전후하여 부정소의 조직분화와 부정소액내 단백질의 변화양상을 분석하는 것은, 정자의 성숙기작을 밝히고 부정소의 기능에 대한 정소의 영향을 알아보는 데 매우 중요하다.

본 실험에서 생후 20일군에 나타난 부정소의 조직분화 양상(Plate I)은 강소의 형성과 상피세포에서 부동점모의 분화면에서 Jean-Faucher 등(1985)의 보고와 일치하는 경향을 보이고 있다. 그러나 본 실험에서 나타난 상피세포의 분화시기는 상피세포의 염색정도와 분화된 세포의 형태적인 차이로 보아 principal cell과 clear cell이 명확히 구별되는 생후 35일 전후라고 사료된다. 그리고 생후 35일군과 80일군에서 부정소의 각 부위별로 principal cell과 clear cell의 분포 양상이 다른 것은, 이들 두 종류의 세포가 단백질의 합성과 분비 및 흡수 작용 등의 세포 기능이 서로 다르며, 부정소의 부위별로도 성숙에 관여하는 기능이 서로 다르다는 보고들(Tomas *et al.*, 1984; Usselman *et al.*, 1986; Eksittkul and Chulavalatanol, 1986)을 고려할 때, 각 실험군에서 나타난 단백질의 전기영동 양상의 변화와 깊은 관계가 있을 것으로 사료된다.

그리고 각 군의 조직분화 양상에서 나타난 특징들 중, 세정관과 부정소관의 강소형성과 부정소의 강소내 정자의 존재여부는, 정소액과 정자가 부정소액의 성분과 조성에 영향을 준다는 것을 암시하고 있다. 따라서 세정관의 강소가 아직 형성되지 않은 생후 20일군의 부정소액은 정소액의 유입이 없이 상피세포에서 분비된 물질과, 혈관에서부터 투과된 물질들에 의해 구성된 것으로 사료되며, 생후 35일군에서는 세정관의 강소가 형성되어 있으므로 부정소로 정소액이

유입되어 혼합된 상태로 볼 수 있다. 그리고 80일군에서의 부정소액은 정자가 부정소로 유입되었으므로 정자의 영향을 받은 것으로 볼 수 있다. 따라서 생후 20일군의 전기영동상에서 나타난 TEP와 ESP들은 정소액의 영향없이 부정소 상피세포에서 합성되어 분비된 단백질로 사료된다. 그리고 20일군에서 나타난 대부분의 단백질들은 35일군과 80일군에서도 나타난 것으로 보아 이 단백질들은 부정소의 구조 유지와 정자의 성숙 환경을 유지하는 데 필요하고, 20일군에만 나타났던 ESP 1종은 부정소의 분화과정에서 특정한 시기에 필요한 단백질로 사료된다.

그리고 정소액이 부정소에 유입된 생후 35일군에서 새로 나타난 4종의 ESP는 상피세포에서 합성되어 분비된 단백질로 추측되는데, 쥐와 토끼에서 수출관(efferent duct)을 결찰한 후 부정소액내 단백질의 조성이 변화한다는 보고들(Jones and Dott, 1980; Nicander *et al.*, 1983)을 고려할 때, 일부 부정소 특이단백질의 합성과 분비에 정소액이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

한편 80일(성체)군에서는 35일군에 없었던 2종의 ESP와 1종의 TEP가 새로 나타났는데 이 단백질들은 분화가 완료된 부정소 상피세포에서 새로 합성되어 분비된 단백질로 사료된다. 그리고 두부에서 미부에 이르는 동안 1종의 TEP와 3종의 ESP는 양적인 증감을 나타냈는데 이러한 변화는 정자가 부정소를 통과하는 동안 유리되는 정자의 세포질 잔기에 존재하던 단백질에 의해 부정소액내의 양이 증가되거나, 특정한 단백질이 성숙중인 정자의 원형질막으로 흡수됨으로써 부정소액내의 양은 감소되는 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해 보면 부정소내로 유입되는 정소액과 정자는 부정소액내 단백질의 성분과 조성에 직접적인 영향을 주며, 부정소 상피세포의 분화상태에 따라 상피세포의 단백질 합성과 분비 및 흡수기능이 조절됨으로써 부정소액내의 단백질들이 변화되는 것으로 사료된다. 그리고 성적 성숙에 따른 정소 및 부정소의 강소형성 시기와 부정소에 정자가 유입되는 시기의 차이는 부정소액의 단백질 조성에 미치는

정자와 정소액의 영향을 분석하는 데 좋은 model system 될 수 있으며, 정자의 성숙에 중요한 역할을 할 것으로 추측되는 TEP와 ESP의 기능이 밝혀진다면 부정소 정자의 성숙기작을 더 잘 이해할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Abou-Haila, A. and M. A. Fain-Maurel, 1985. Postnatal differentiation of the enzymatic activity of the mouse epididymis. *Int. J. Androl.* **8**:441-458.
- Acott, T. S., D. F. Katz, and D. D. Hoskins, 1983. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: Effect of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* **29**:389-399.
- Arsilan, M., M. Z. Haider, and M. H. Qazi, 1986. Characterization and androgen dependence of specific proteins in the epididymis of adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Arch. Androl.* **16**:67-74.
- Bedford J. M., 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* **28**:108-120.
- Brooks, D. E. and S. J. Higgins, 1980. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fert.* **59**:363-375.
- Brooks, D. E. and K. Tiver, 1983. Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **69**:651-657.
- Brown, D. V., R. P. Amann, and L. M. Wagley, 1983. Influence of rete testis fluid on the metabolism of testosterone by cultured principal cells isolated from the proximal or distal caput of the rat epididymis. *Biol. Reprod.* **28**:1257-1268.
- Cooper, T. G., 1986. Function of the Epididymis and its Secretory Product, In: *The Epididymis Sperm Maturation and Fertilisation* (Cooper, T. G. ed.) Springer-Verlag, New York. pp. 117-230.
- Cuasnicu, P. S., F. G. Echeverria, A. Piazza and J. A. Blaquier, 1984a. Addition of androgen to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **70**:541-547.
- Cuasnicu, P. S., F. G. Echeverria, A. Piazza, L. Pinerio, and J. A. Blaquier, 1984b. Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **71**:427-431.
- Dacheux, J. L. and J. K. Voglmayer, 1983. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* **29**:1033-1046.
- Dadoune, J. P., M. A. Fain-Maurel, and M. Baures, 1985. Autoradiographic study of labeled amino acid incorporation into clear cells of mouse epididymis. *Arch. Androl.* **14**:199-207.
- Danzo, B. J., T. G. Cooper, and M. C. Orgebin-Crist, 1977. Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymis of sexually mature and immature rabbit and observation morphological change in the epididymis following ligation of the ductuli efferent. *Biol. Reprod.* **17**:64-73.
- Eksittikul, T. and M. Chulavalantol, 1986. Increase in fluid viscosity during epididymal transit and the immobilization of rat epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl.* **9**:229-240.
- Flickinger, C. J., 1979. Synthesis, transport and secretion of protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electronmicroscope radioautography. *Biol. Reprod.* **20**:1015-1030.
- Flickinger, C. J., 1981. Regional difference in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* **25**:871-883.
- Flickinger, C. J., 1985. Radioautographic analysis of the secretory pathway for glycoproteins in principal cell of the mouse epididymis exposed to [<sup>3</sup>H]-fucose. *Biol. Reprod.* **32**:377-389.
- Fritz, I. B., K. Burazy, B. Setchell, and O. Blaschuk, 1981. Ram rete testis fluid contains a protein (Clusterin) which influence cell-cell interaction *in vitro*. *Biol. Reprod.* **29**:1173-1188.
- Hall, J. C. and G. J. Killian, 1987. Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biol. Reprod.* **36**:709-718.
- Hinton, B. T., A. M. Snowell, and B. P. Setchell, 1979. The concentration of camitine in the luminal fluid of testis and epididymis of the rat and some animals. *J. Reprod. Fert.* **56**:105-111.
- Hoffmann, D. S. and G. J. Killian, 1981. Isolation of epithelial cells from the corpus epididymis and analysis for glycerylphosphorylcholine, sialic acid and protein. *J. Exp. Zool.* **217**:93-102.
- Holland, M. K. and M. C. Orgebin-Crist, 1988. Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. *Biol. Reprod.* **38**:487-496.
- Jean-Faucher, C., M. Berger, M. de Turckheim, G. Veyssiere, and C. Jean, 1985. Testosterone and dihydrotestosterone levels in the epididymis, vas deferens and preputial gland of mice during sexual maturation. *Int. J. Androl.* **8**:44-57.

- Jones, R., 1978. Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comp. Biochem. Biophys.* **61B**:365-370.
- Jones, R. and H.M. Dott, 1980. Changes in luminal plasma and disappearance of spermatozoa from the ligated cauda epididymis of the androgen-deficient rabbit. *J. Reprod. Fert.* **60**:65-72.
- Klinefelter, G. R., R. P. Amann, and R. H. Hammerstedt, 1982. Culture of principal cells from the rat caput epididymis. *Biol. Reprod.* **26**:885-901.
- Kohane, A. C., L. Pinerio, and J. A. Blaquier, 1983. Androgen controlled synthesis of specific proteins in the rat epididymis. *Endocrinology* **112**:1590-1596.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Luft, J. H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**:409.
- Moore, H. D. M., 1981. Effects of castration on specific glycoprotein secretion of the epididymis in the rabbit and hamster. *J. Reprod. Fert.* **61**:347-354.
- Moore, H. D. M., T. D. Hartman, and J. P. Prgor, 1983. Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the lumen. *Int. J. Androl* **6**:310-318.
- Moore, H. D. M., T. D. Hartman, and C. A. Smith, 1986. In vitro culture of hamster epididymis epithelium and induction of sperm motility. *J. Reprod. Fert.* **78**:327-336.
- Nicander, L., K. I. Osman, L. Ploen, H. P. Bugge, and K. N. Kvisgard, 1983. Early effect of efferent duct ligation on the proximal segment of the rat epididymis. *Int. J. Androl.* **6**:91-102.
- Orgebin-Crist, M. C. and N. Jahad, 1978. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: Inhibition by anti-androgen and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology* **103**:46-53.
- Primakoff, P., H. Hyatt, and J. Tredick-Kline, 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* **104**:141-149.
- Shabanowitz, R. B. and G. J. Killian, 1987. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. *Biol. Reprod.* **36**:753-768.
- Tezon, J. G., M. H. Vazquez, L. Pineiro, M. A. de Laminat, and J. A. Blaquier, 1985. Identification of androgen-induced proteins in human epididymis. *Biol. Reprod.* **32**:584-590.
- Thomas, T. S., A. B. Reynolds, and G. Oliphant, 1984. Evaluation of the site synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labelling techniques. *Biol. Reprod.* **30**:693-705.
- Turner, T. T., C. E. Jones, S. S. Howards, L. L. Ewing., B. Zegeye, and G. L. Gusalus, 1984. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology* **115**:1925-1932.
- Usselman, M. C., R. A. Cone, and D. P. Rossignol, 1985. Rat cauda epididymal fluid is a mucus. *J. Androl.* **6**:315-320.
- Voglmayr, J. K., G. Fairbanks, and R. G. Lewis, 1983. Surface glycoprotein changes in ram spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* **29**:767-775.
- White, M. G., Y. S. Huang, L. L. Tres, and A. L. Kierszenbaum, 1982. Structural and functional aspects of cultured epididymal epithelial cells isolated from pubertal rats. *J. Reprod. Fert.* **66**:475-484.
- Young, L. G., B. T. Hinton, and K. G. Gould, 1985. Surface changes in chimpanzee sperm during epididymal transit. *Biol. Reprod.* **32**:399-412.
- Zaneveld, L. D. J., 1982. The Epididymis. In: *Biochemistry of Mammalian Reproduction and Fertilization* (Zaneveld, L. D. J. ed.) New York, pp. 37-64.

(Accepted May 13, 1989)

---

**Lumination of Epididymis and Electrophoretic Pattern of Proteins in Epididymal Fluid during Sexual Maturation in Mouse**

Moon Kyoo Kim, Hyun Soo Yoon, Kyoo Wan Choi and Yong-Dal Yoon(Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

In order to study the influence of spermatozoa and testicular fluid on the component and composition of proteins in epididymal fluid of mice, histological differentiation of testis and epididymis were observed during sexual maturation, and the proteins in epididymal fluids collected according to the characteristics of lumination were analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE).

In 10 day-old mouse, both of testis and epididymis were undifferentiated. In 20 day-old mouse, epididymis was primitively luminated, but testis was not. In 35 day-old mouse, both of testis and epididymis were luminated and epididymal epithelium was differentiated into principal cells and clear cells. Spermatozoa were not transferred into epididymis yet. However, in 80 day-old mouse, both of testis and epididymis were fully differentiated and spermatozoa were transferred into epididymis.

In electrophoretic pattern of proteins in epididymal fluid, a total of 28 kinds of proteins were identified, which were different from those of their sera. 12 kinds out of these proteins were epididymal specific protein(ESP) detected in epididymal fluid only, and the other 16 kinds(TEP) were also detected in testicular fluid. The proteins in epididymal fluid changed during sexual maturation and 3 kinds of the proteins changed quantitatively according to epididymal regions in adult.

It may be concluded from the above results that the component and composition of the proteins in epididymal fluid changed by the influx of testicular fluid including spermatozoa into epididymis and regulation of the protein synthesis, secretion and/or absorption by the epididymal epithelium. Therefore it is strongly suggested that ESP and TEP in epididymal fluid play somehow significant roles on the maturation of epididymal spermatozoa.



## Abbreviation

Cc : clear cell

CD: cauda epididymal fluid

CP: caput epididymal fluid

CR: corpus epididymal fluid

Pc : principal cell

S : serum

Sc: stereocilia

Sd: spermatid

Sp: spermatozoa

St : spermatocyte

T : testicular fluid

**PLATE I.** Microphotographs of the seminiferous tubules (a), caput epididymal tubules (b) and cauda epididymal tubules (c) during sexual maturation in mice (X 370).

**Fig. 1.** Sections of testis and epididymis of 10 day-old mouse, showing the primitive lumen in caput epididymis and epithelia in caput (1b) and cauda (1c) epididymis without differentiation.

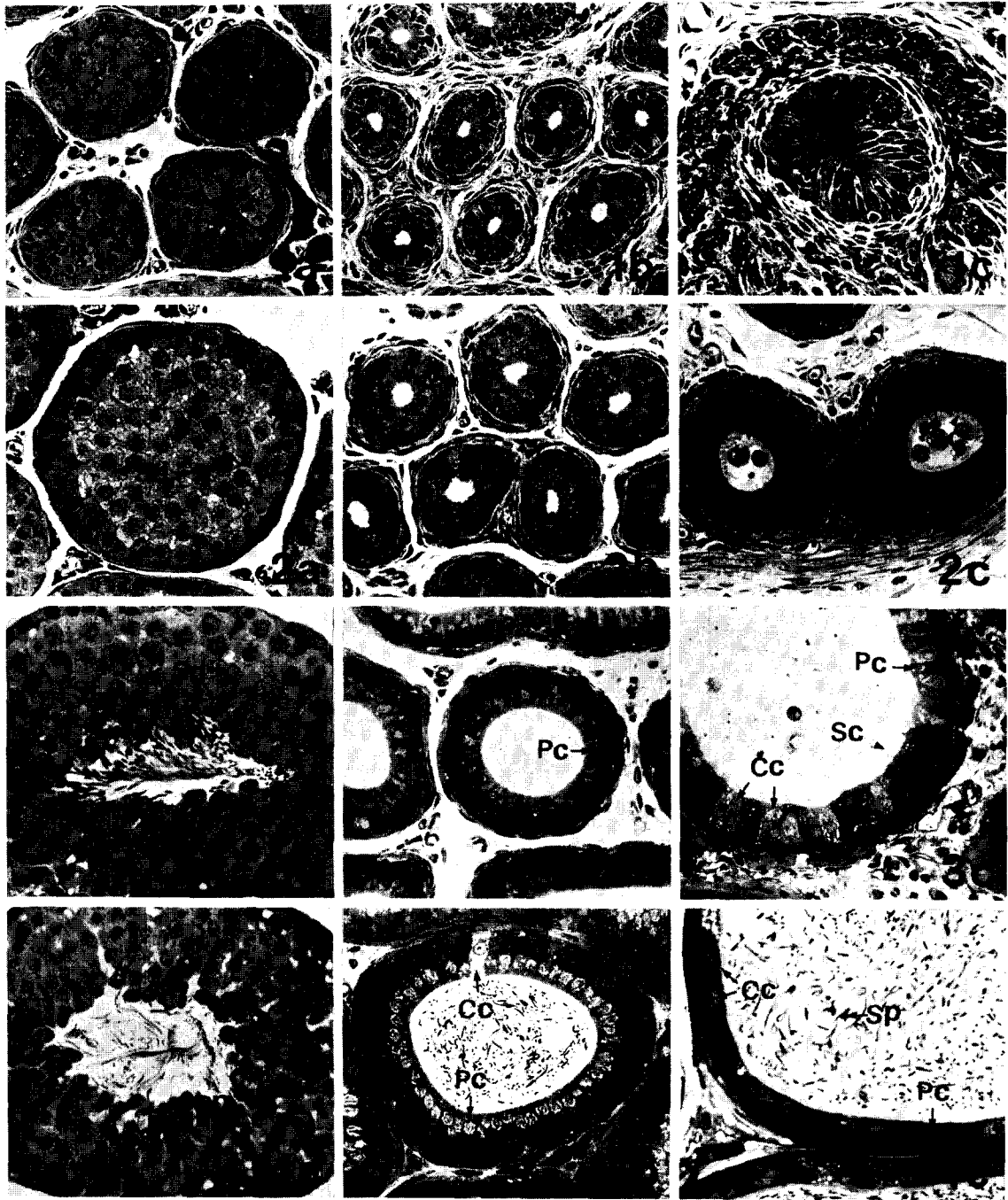
**Fig. 2.** Sections of testis and epididymis of 20 day-old mouse, showing the differentiating epithelial cells in caput epididymis (2b) and primitive lumen with stereocilia in cauda epididymis (2c).

**Fig. 3.** Sections of testis and epididymis of 35 day-old mouse, showing the germ cells at various stages of spermatogenesis in seminiferous tubules (3a) and developing epithelial cells of caput (3b) and cauda (3c) epididymis differentiated into principal cell (Pc) and clear cell (Cc), but no spermatozoa in the lumen yet.

**Fig. 4.** Sections of testis and epididymis of 80 day-old (adult) mouse, showing the fully grown lumen of seminiferous tubule (4a) and a lot of spermatozoa and typical phases of the well-differentiated epithelial cells of caput (4b) and cauda (4c) epididymis.

**PLATE II.** Photographs of electrophoretic pattern of the proteins in the testicular and epididymal fluids from 20, 35 and 80 day-old mice.

# PLATE I



# PLATE II

