

졸복, *Takifugu pardalis* 정액의 성상과 정자 운동성

고 강 희*

전남대학교 수산해양대학 해양기술학부

Milt Property and Sperm Motility of Panther Puffer, *Takifugu pardalis*

Kang Hee Kho*

Faculty of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

In the present study, attempts were made to find out the physico-chemical properties of milt and the sperm motilities in various osmotic conditions using Panther puffer, *Takifugu pardalis*. The average concentration of sperm in the milt was $12.1 \pm 3.2 \times 10^9$ /mL. pH and osmolality of seminal plasma were 8.2 ± 0.3 , 385.5 ± 12.5 mOsm/kg, respectively. Spermatozoa were immotile when the milt was mixed with solutions (electrolyte or non-electrolyte) of lower osmolality than the average seminal plasma osmolality (385.5 ± 12.5 mOsm/kg), but became motile after mixing milt with hyperosmotic solutions.

Key words : *Takifugu pardalis*, sperm, milt, motility, osmolality

서 론

어류양식에서 정자의 보존기술은 자연산 어미를 이용하여 인공수정시킬 때, 어획된 암수의 성비불균형에 따른 어려움을 극복할 수 있게 하며, 암수의 성숙 및 배우자 방출에 동시성이 없을 경우라도 인공수정을 용이하게 한다. 그리고 수컷 친어의 수송을 필요로 하지 않고, 재래종 및 우량종의 종보존이 가능하며, 특정 형질을 가진 정자를 이용하여 유전육종이 가능해진다는 장점이 있다(Chang *et al.*, 1995). 1853년 De Quatrefages에 의해 어류의 정자활성이 연구된 이래 어류 정자의 운동성과 보존은 수산과학자들의 관심을 끌어들였다. 경골어류 정자의 운동활성은 정액의 질과 정자의 생존능력을 평가하는 데에 활용되고 있으며, 일부 연구자들은 정자의

운동성과 수정능력 사이에 밀접한 상관관계가 있는 것으로 평가하고 있다(Lahnsteiner, 1996). 어류정자의 운동조절기구에 대해서는 연어과 어류에서 세포막의 K⁺ channel의 역할과 2차 전달자로서 cAMP-의존 단백질 인산화의 역할이 밝혀졌다(Kho *et al.*, 2001, 2003, 2004). 연어과 어류에 있어서는 정자의 운동은 정자의외에 존재하는 Ca²⁺의 세포내 유입으로 축적된 cAMP에 의해 개시되는 것으로 밝혀지고 있다. 해산어류와 담수어류의 정자는 각각 고삼투도와 저삼투도에 의한 물리적인 자극에 의해 정자의 운동이 개시되는 것으로 알려지고 있지만 아직 이를 뒷받침할 수 있는 실험적 자료가 부족한 실정이다. 본 연구에서는 산업적으로 유용한 해산 어류인 복어 정자의 보존기술을 개발하기 위한 기초자료를 얻고자 졸복을 실험재료로 하여 정액성상과 정자의 운동활성을 파악하여 인공수정과 정액의 냉장·동결보존에 관한 기초자료를 얻고자 한다.

*Corresponding author: kkh@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

실험자료는 2006년 3월에서 6월에 걸쳐 여수 근해에서 채집된 줄복의 정액을 사용하였다. 정액은 복부 압박법으로 채취하여 실험에 사용하기전 까지 얼음에서 보관하였다. 정자의 농도는 혈구계산관을 이용하여 측정하였고, 일반적인 혈액분석 방법인 microhematocrit 변법 (Bouck and Jacobson, 1976)에 의해 spermatocrit를 측정하였다. 정장의 삼투질 농도와 pH 측정을 위해서 정액을 원심분리 (10,000 rpm, 10분) 한후 삼투압 측정기 (The Advanced Osmometer)와 pH 측정기 (Corning 530)를 사용하여 분석하였다. 정장의 총 단백질과 총 지질 함량은 각각 biuret반응법과 비색정량법으로, Na 및 K 농도는 불꽃분광도법으로 분석하였다.

정자가 슬라이드 글라스에 달라붙는 것을 방지하기 위하여 1% 소 혈청액을 이용하여 슬라이드 글라스를 코팅한 후 실험에 사용하였다. 운동활성을 동시에 유도하기 위하여 2단계 희석법 (Kho, 2001)을 이용하였다. 해산 경골어류용 생리식염수 (a physiological saline, ASP; 230 mM NaCl, 8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 3.7 mM MgCl₂, 0.2 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES-pH 7.8)에 1차 희석한 정액 (10배희석)을 각기 다른 삼투도 용액 (activation solution, AS)에 2차로 100배 희석하여 광학현미경하에서 전진운동하는 정자의 비율을 측정하였다.

결 과

정액과 정액을 원심분리하여 얻은 정장의 물리화학적

Table 1. Properties of semen in *Takifugu pardalis*

Property	Milt	Seminal fluid
Spermatocrit	68.7±2.8	-
Sperm concentration (×10 ⁹ /mL)	12.1±3.2	-
Osmolality (mOsm/kg)	-	385.5±12.5
pH	-	8.2±0.3

Table 2. Chemical properties of seminal fluid in *Takifugu pardalis*

Properties	Seminal fluid
Total pretein (g/100 mL)	0.08±0.03
Total lipid (mg/100 mL)	32.4±7.8
Na ⁺ (mEq/L)	115.6±6.5
K ⁺ (mEq/L)	24.3±4.1

성상은 Table 1과 같다.

정자의 농도는 mL당 12.1±3.2×10⁹마리였다. 정장의 pH는 8.2±0.3이었으며, 삼투질농도는 385.5±12.5 mOsm/kg이었다 (Table 1).

또한 정장의 총 단백질 함량은 0.08±0.03 g/100 mL, 총지질 함량은 32.4±7.8 mg/100 mL이었다 (Table 2).

줄복 정자는 정액을 정장의 삼투도 (300 mOsm/kg)에 비해 저장 또는 등장의 전해질 용액 또는 비전해질 용액에 정액을 희석하였을 때는 운동성이 억제되었다 (Figs. 1, 2). 정장에 비해 고삼투도 용액에 정액을 희석하였을 때 정자는 운동을 개시하여 외부의 용액의 삼투

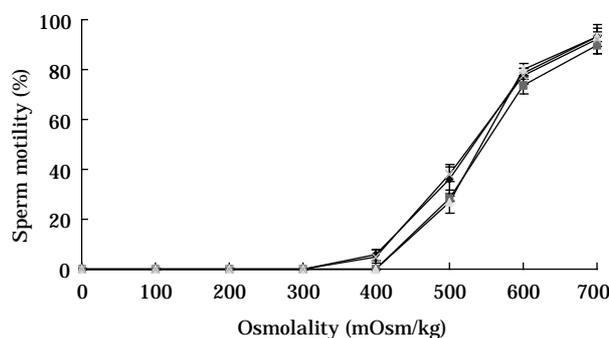


Fig. 1. Effects of different osmolalities of electrolyte solutions on the sperm motility in Panther puffer. The semen was diluted in ASP at the ratio of 1 : 10. One volume of the sperm of the sperm suspension was suspended in 100 volumes of AS containing various concentration of NaCl (◆), KCl (■), RbCl (▲) and CsCl (×). The data are expressed as mean ±SD (n=5).

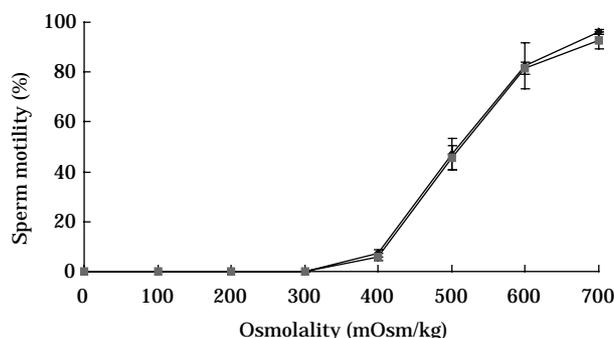


Fig. 2. Effects of different osmolalities of non-electrolyte solutions on the sperm motility in Panther puffer. The semen was diluted in ASP at the ratio of 1 : 10. One volume of the sperm of the sperm suspension was suspended in 100 volumes of AS containing various concentration of mannitol (▲) and sucrose (■). The data are expressed as mean ±SD (n=5).

도가 증가함에 따라 활발한 운동성을 나타내었다 (Figs. 1, 2).

고 찰

경골어류 정자의 운동활성은 정액의 질과 정자의 생존능력을 평가하는데에 활용되고 있으며, 일부 연구자들은 정자의 운동성과 수정능력사이에 밀접한 상관관계가 있는 것으로 평가하고 있다 (Lahnsteiner *et al.*, 1996). 어류 정자의 운동활성 외에도 정자와 정장의 물리화학적 특성에 관한 지식은 어류의 번식력을 평가하거나 수정기구를 이해하는 기준이 된다 (De Kruger *et al.*, 1984). 본 연구에서 졸복 정장의 pH는 8.2 ± 0.3 의 약 알칼리로 나타났는데, 이는 해산어류인 자주복, *Takifugu rubripes*의 8.2 ± 0.2 (Chang, 1997), 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii*의 8.3 (Chang *et al.*, 1995), 대서양 연어, *Salmo salar*의 8.3 (Hwang and Idler, 1969)과 비슷한 경향을 보였다. 한편 졸복 정장의 삼투질농도는 385.5 ± 12.5 mOsm/kg로, 연어과 어류인 무지개송어, *Onchorynchus mykiss*의 297 mOsm/kg (Ciereszko and Dabrowski, 1993), 잉어과의 300 mOsm/kg (Morisawa *et al.*, 1983), pejerrey, *Odontesthes bonariensis*의 331 mOsm/kg (Strussmann *et al.*, 1994), 해산어인 능성어, *Epinephelus malabaricus*의 330~350 mOsm/kg (Chao *et al.*, 1992), 감성돔의 359 mOsm/kg (Morisawa and Hayashi, 1985) 보다 높았다.

졸복 정장의 총단백질 함량은 0.08 ± 0.03 g/100 mL로 잉어의 0.13 mg/100 mL (De Kruger *et al.*, 1984)에 비해 다소 낮은 경향을 보였다. 정장 단백질의 역할에 관해서는 구체적으로 밝혀진 바가 없으나, 정장의 삼투질 농도를 유지하는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다 (De Kruger *et al.*, 1984). 졸복 정장내의 총 지질함량은 32.4 ± 7.8 mg/100 mL로 자바틸라피아, *Oreochromis mossambicus*의 0~0.3 mg/100 mL (De Kruger *et al.*, 1984)에 비해 월등히 높았고, 잉어, *Cyprinus carpio*의 9.8~131.6 (De Kruger *et al.*, 1984) 보다는 낮은 수준이었다. Stoss (1983)는 정자의 냉장보존 방법에 대해서 필수 불가결한 요인으로서 운동조절, 산소의 공급, 습도의 유지 및 제균의 4가지 조건을 열거하며 적절한 희석액의 사용은 보존 정자의 물리·화학적 환경의 유지와 관리에 유효함을 지적하고 있다. 사실 지금까지 어류 정자의 냉장보존을 실시한 많은 실험에서 미희석 보존에 비해서 희석 보존이 운동능력과 수정 능력의 유지에 효과가 있다고 보고하고 있다 (Hogendoorn and Vismans, 1980; Harvey

and Kelly, 1984). 희석 보존을 실시할 경우에는 희석액의 선택이 보존 효과를 좌우하는 최대의 요인이 되고, 해수 중에서 산란하는 뱀장어, *Anguilla Japonica* (Ohta and Izawa, 1996)와 담수어인 잉어, *Cyprinus carpio* (Ohta and Tsuji, 1998)의 정자에서는 지금까지 희석액의 이온 조성의 차이가 보존 정자의 운동능력에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 어류의 정자를 체외에서 유지하는 방법으로서는 먼저 정자의 대사 활성을 억제하기 위하여 운동 개시를 억제하는 조건을 검토할 필요가 있다고 생각된다. 무지개송어, *Onchorynchus mykiss*를 포함한 연어과 어류의 정자의 운동개시는 세포를 둘러싸고 있는 K^+ 이온 농도의 저하가 운동을 개시시키는 방아쇠임이 명백히 밝혀져 왔다 (Kho *et al.*, 2001, 2003). 즉 세포의 K^+ 농도의 저하가 정자의 세포막의 이온채널을 매개로 한 세포내 K^+ 유출을 유도하고 (Kho *et al.*, 2001, 2003), 여기에 의해 세포내로의 Ca^{2+} 의 유입이 cAMP의 합성을 자극하여 (Kho *et al.*, 2001, 2004), cAMP 의존성 단백질의 인산화가 편모장치의 활성화를 이끌어내는 것으로 보고되고 있다 (Morisawa and Okuno, 1982; Morisawa and Hayashi, 1985). 본 연구에서는 졸복 정자를 전해질 용액이 NaCl, KCl, RbCl, CsCl 그리고 비전해질인 manitol, sucrose의 삼투질농도를 달리하여 정자 운동성을 측정된 결과 정장의 삼투도 이상에서 활발한 운동성을 보였다. Morisawa *et al.* (1992)은 청어의 정자가 정장과 등장인 용액에서는 움직이지 않지만, 고장액에 희석되면 운동을 개시한다고 하였다. 또 Morisawa and Suzuki (1980)는 대구 및 가자미류의 움직이지 않던 정자가 해수나 해수와 동일한 삼투질 농도를 가진 용액에서 운동을 개시한다고 하여, 이들의 언급과 이 연구의 결과는 정자의 운동성을 촉진하거나 억제하는 요인이 환경수의 삼투질농도임을 나타낸다. 한편 담수어류에서는 해수어류와 반대로 정장보다 낮은 삼투질 농도에서 높은 정자의 운동성이 관찰되다가, 삼투질 농도 상승과 함께 운동성이 감소하는 것을 알려져 있다 (Morisawa *et al.*, 1983; Strussmann *et al.*, 1994). 앞으로 각종 이온채널 억제제를 사용하여 특정 이온채널의 관련여부, 세포막의 막전위변화, Ca^{2+} , cAMP 등 세포내 2차 신호전달자의 관련여부 등 세포생물학 수준의 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

정자의 냉장·냉동보존은 정자를 생존시키면서 효율적으로 정자의 운동성을 억제시키는 것이다. 따라서 중요 수산동물의 정자의 운동성 조절요인에 관한 연구는 정자의 보존기법, 인공수정법 개발에 대한 기초자료로 활용될 뿐만 아니라 세포의 정보전달 기구 해명에도 크게 기여할 것이다.

적 요

졸복의 정액의 물리화학적 성상과 정자운동성에 관한 기초자료를 얻었다. 졸복 정액의 평균농도, pH 및 삼투질농도는 각각 $12.1 \pm 3.2 \times 10^9/\text{mL}$, 8.2 ± 0.3 , $385.5 \pm 12.5 \text{ mOsm/kg}$ 였다. 정자는 정장의 삼투질농도 ($385.5 \pm 12.5 \text{ mOsm/kg}$)에 비해서 저장 또는 등장의 삼투질농도에서는 운동성이 억제된 반면, 장장에 비해 고장삼투질농도에서 정자의 운동이 개시되어 삼투질농도가 증가함에 따라 활발한 운동성을 보였다.

사 사

본 연구를 수행하는 데 있어서 실험어 채집과 실험 및 자료정리에 도움을 주신 전남대학교 자원생물생리학 연구실원들께 감사드립니다.

인 용 문 헌

Bouck, G.R. and J. Jacobson. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 105 : 534~535.

Chang, Y.J., H.K. Lim and K.H. Kho. 1995. Properties of semen and sperm motility in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *J. Aquaculture*, 8 : 149~157.

Chang, Y.J. 1997. Present and future studies on the cryopreservation of fish gametes. *Suisanzoshoku*, 45 : 557~564.

Chao, N.H., H.P. Tsai and I.C. Liao. 1992. Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fish. Sci.*, 5 : 103~116.

Ciereszko, A. and K. Dabrowski. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109 : 367~373.

De Kruger, J.C., G.L. Smith, J.H.J. Van Vuren and J.T. Ferreira. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish Biol.*, 24 : 263~272.

De Quatrefages, M.A. 1853. Recherches sur la vitalite des spermatozoides de quelques poissons d'eau douce. *Annales des sciences naturelles: Troisieme serie*, 19 : 341~369.

Harvey, B. and R.N. Kelley. 1984. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*, 36 : 85~95.

Hogendoorn, H. and M.M. Vismans. 1980. Controlled propagation of the African catfish, *Clarias lazera*. *Aquaculture*, 21 : 39~53.

Hwang, P.C. and D.R. Idler. 1969. A study of major cations, osmotic pressure and pH in seminal components of Atlantic salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26 : 413~419.

Kho, K.H. 2001. Studies of the transmembrane cell signaling for the initiation of sperm motility in salmonid fishes. Ph.D. thesis In "Life Science Institute, Graduate School of Science", University of Tokyo, Tokyo.

Kho, K.H., M. Morisawa and K.S. Choi. 2003. Membrane hyperpolarization increases cAMP to induce the initiation of sperm motility in Salmonid fishes, rainbow trout and masu salmon. *J. Micro. Biotech.*, 13 : 833~840.

Kho, K.H., M. Morisawa and K.S. Choi. 2004. The Role of Ca^{2+} and calmodulin on the initiation of sperm motility in Salmonid Fishes. *J. Micro. Biotech.*, 14 : 456~465.

Kho, K.H., S. Tanimoto, K. Inaba, Y. Oka and M. Morisawa. 2001. Transmembrane Cell Signaling for the Initiation of Trout Sperm Motility: Roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. *Zoological Science*, 18 : 919~928.

Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Wiesmann and R. Patzner. 1996. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *Prog. Fish. Cult.*, 58 : 149~159.

Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa and K. Yasuda. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* 107 : 95~103.

Morisawa, M. and H. Hayashi. 1985. Phosphorylation of a 15 K axonemal protein is trigger initiating trout sperm motility. *Biomed. Res.*, 6 : 181~184.

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, H. Shimizu, S. Morisawa and K. Yasuda. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.*, 107 : 95~103.

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

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.

Ohta, H. and M. Tsuji. 1998. Ionic environment necessary

- for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during in vitro storage. Fish. Sci., 64 : 547~552.
- Ohta, H. and T. Izawa. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonicus*) spermatozoa. Aquaculture, 142 : 107~118.
- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. Fish Physiology, IX B. pp. 305~350.
- Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fish. Sci., 60 : 9~13.

Received : April 2, 2007
Accepted : May 11, 2007