

최 종
연구보고서

웅성페로몬과 내동성정자 개발에 의한
돼지의 번식효율 향상에 관한 연구

Study on Reproductive Efficiency Improvement of
Pig by Development of Boar Pheromone and Cold
Shock Resistance Sperm

연구기관
충남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “응성페로몬과 내동성정자 개발에 의한 돼지의 번식효율 향상에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 박 창 식

세부연구책임자 : 성 낙 도

세부연구책임자 : 박 창 식

세부연구책임자 : 김 철 호

요 약 문

I. 제 목

웅성페로몬과 내동성정자 개발에 의한 돼지의 번식효율 향상에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

산업이 국제화되고 무한경쟁시대에 돌입하면서 우리나라 양돈산업이 국제경쟁력을 갖기 위해서는 생산비의 절감과 첨단기술의 개발이 절실히 요구되고 있다. 생산비 중에 노동비가 차지하는 비율 특히 분만-비육돈의 관리에서 노동비가 차지하는 비율은 7.9~8.5%로 상당히 높다. 분만-비육돈 관리의 생산비를 절감시키는 방법은 여러 가지가 있으나 그 중의 하나가 번식효율의 증진이다. 양돈산업이 전업화 내지 기업화되면서 밀폐된 공간에서 종빈돈들을 대규모 사육하므로 종빈돈의 번식효율을 증진하고 관리비를 절감하기 위해서는 기존의 종모돈 접촉, 운반자극, 외인성 호르몬 투여에 의한 발정동기화 방법보다 노동력을 절약할 수 있을 뿐만 아니라 정확하고 체계적이며 친환경적인 발정동기화 방법의 개발이 요구되고 있다. 그러한 정확하고 체계적이며 친환경적인 발정동기화 방법의 개발이 웅성페로몬의 개발이다. 또한 종빈돈의 관리비용 절감은 물론 종모돈의 관리비용을 줄이고 이용효율을 확대하기 위하여 액상정액을 이용한 인공수정이 실시되고 있다. 그러나 액상정액은 보존기간이 4~5일 정도로 짧기 때문에 종모돈의 이용효율을 극대화시키는데 문제점으로 대두되고 있다. 또한 동결정액은 액상정액에 비하여 수태율과 산자수가 적어서 돈군에 특별한 유전형질을 도입할 때를 제외하고는 아직 실용화되지 않고 있다. 그러나 장기적인 안목에서는 돼지에서도 소처럼 동결정액을 이용한 인공수정의 보급이 필요하다.

따라서 본 연구는 분만-비육돈의 관리 및 번식효율을 제고시키기 위한 웅성페로몬을 개발하고, 내동성정자를 생산하는 우량종모돈의 내분비학적 기전과 내동성 정자의 세포학적 특성구명과 동결정액 실용화를 통해서 양돈산업의 생산성을 향상시키고자 실시하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 내용은 제 1 세부과제인 음성페로몬 물질의 탐색 및 응용, 제 2 세부과제인 내동성 정자생산 종모돈의 내분비 및 세포학적 기전구명과 실용화, 제 3 세부과제인 음성페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 분석으로 구성되었다. 세부과제별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 제 1 세부과제

가. 돼지 성 유인물질의 정성분석 및 구조확인: 5 α -androst-16-en-3-one과 5 α -androst-16-en-3-ol

나. 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색: I. 5 α -androst-16-en-3-one 유사체들의 리간드에 기초한 분자 유사성과 물리화학 파라미터

다. 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색: II. 휘발성 냄새분자의 리간드와 porcine odorant binding protein(pOBP) 사이의 결합 친화력에 관한 홀로그래피적 QSAR모델

라. 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색: III. 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofuran 유도체와 porcine odorant binding protein 사이의 결합 친화력에 관한 비교 분자장분석

마. 돼지 페로몬 성 물질의 탐색: Salivary lipocalin으로부터 분자 동역학적 모의실험과 virtual screening

바. 돼지 페로몬 성 물질의 예측과 Tetrahydrofuran-oxycyclohexane 유도체의 합성

사. 돼지 페로몬 성 물질의 실증실험; Tetrahydrofuran-oxycyclohexane 유도체와 androstenone의 독성 예측과 페로몬 특성

2. 제 2 세부과제

가. 종모돈의 정액성상, 동결-융해후 정자의 생존성, 혈청중 FSH, LH, estradiol-17 β 및 testosterone 농도에 미치는 품종과 계절의 영향

나. 원정액과 동결정액에서 유세포분류기를 이용한 정자세포의 세포막 완전성과 미토콘드리아 활성의 분석

다. 원정액과 동결정액의 Confocal Imaging 기술을 이용한 정자내 Ca 이온 조절기전 구명

라. 원정액과 동결-융해정액의 정자내 ATP함량과 내동성 정자의 수정능력

3. 제 3 세부과제

가. 인공수정센터의 적정규모와 경제성 분석

나. 웅성페르몬 이용시 생산성 향상 효과 및 경제적 타당성 분석.

다. 내동성 정자 이용시 생산성 효과 및 경제적 타당성 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 진의

1. 연구개발 결과

가. 돼지 음성 페르몬성 물질인 5 α -androst-16-en-3-one(S₁)의 유사체들을 탐색하기 위하여 lipocalin의 기질 분자로 추정되는 S₁의 리간드에 기초하여 55개의 androstanone 유도체들에 대한 물리-화학 파라미터들을 계산하고 비교 검토하였다. 그 결과 5 α -androstan-3,11,17-trione(S₂)와 4-androsten-19-ol-3,17-dione(S₃)은 기존의 페로몬성 물질인 S₁을 대체할 수 있는 새로운 돼지 음성 페로몬성 화합물로 예상되었다.

나. 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 음성 페로몬성 분자를 탐색하고자 일련의 냄새분자 유도체들의 정량적인 구조와 수용체인 porcine odorant binding protein(pOBP) 간의 결합 친화력 상수(p(Od)₅₀)에 대한 HQSAR, CoMSIA, COMFA 모델을 검토하였다.

다. HQSAR 모델과 CoMFA 모델로부터 냄새 분자중, 특정 원자나 원자단들의 결합 친화력성 여부를 검토하고 페로몬성 분자의 구조적인 특성에 관한 정보를 얻었다. 수천종의 tetrahydrofuran 유사체 중에서 2종이 가장 높은 결합친화력을 가진 페로몬 물질(tetrahydrofuranoxycyclohexane:TFC-A, TFC-B)로 예측된 바, 세 개의 QSAR 모델을 사용해서 정보를 얻었다.

라. 음성 페로몬의 수용체로 알려진 타액 lipocalin(IGM6)을 가지고 다양한 화합물과의 virtual screening을 실시하고 검토하였다. 순수하게 소수성적인 상호작용만으로 결합할 수 있는 AQ 6060 (Score: -38.1kcal/mol & Volume:182Å³)의 페로몬 물질을 얻었다.

마. 결합 친화력 상수가 가장 높게 예측되었던 tetrahydrofuranoxycyclohexane (TFC-A와 TFC-B)에 대한 독성 검사를 TOPKAT 프로그램에 의해서 실시하였다. TFC-A는 독성이 전혀 없는 것이 입증되었다. 미경산돈을 이용한 실증시험 결과 음성 페로몬을 사용한 처리구가 사용하지 않은 처리구 보다 20%정도 더 높은 발정 동기화 현상을 나타내었다.

바. FSH의 농도가 낮을수록 정액생산량이 높은 것으로 나타났으며, 혈청 중 testosterone의 농도가 높을수록 동결-융해 정자의 운동성 및 정상침체의 비율이 높은 것으로 나타났다.

사. 유세포분류기를 이용한 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활성을 분석하기 위해서는 원정액이나 동결정액에서 모두 세척배지와 세척온도가 중요한 요인이었다.

아. Ca 이온의 유입과 방출기전의 이상은 정자의 동결보존기간동안 정자 내 Ca 이온의 고갈로 손상을 받는다.

자. 정자의 ATP 농도는 품종간에 차이가 없었으나 개체간에는 차이점을 인정할 수 있었다. 동결정액은 원정액에 비하여 유의하게 낮은 ATP 농도를 나타내었으며, ATP 농도와 정자의 운동성과는 밀접한 연관관계가 있었다. 동결-융해후 50%이상의 운동성과 정상침체를 가지는 내동성 정자는 인공수정에 이용될 수 있음이 입증되었다.

차. 음성 페로몬과 우수한 경제 형질을 가진 내동성 정자를 사용할 경우 경제적 이익이 있는 것으로 분석되었다.

2. 활용 방안

페로몬을 이용한 자극은 미경산돈에서 번식효율과 관리를 개선시키기 위한 매우 유용하고 실용적인 방법이 될 것이다. 내동성 정자를 함유한 동결-융해 정액은 극히 우수한 유전형질을 가진 정자의 수출 및 수입, 돈군내 새로운 혈액갱신 등의 특별한 조건하에서 적정한 분만율과 산자수를 공급할 것이다. 또한 본 연구는 난모세포의 체외수정, 형질전환 돼지의 생산 등의 기초연구에 기여할 것이다.

SUMMARY

I . Title

Study on Reproductive Efficiency Improvement of Pig by Development of Boar Pheromone and Cold Shock Resistance Sperm

II . Purpose and Necessity of the Research

Under our challenging circumstances today, we need to develop new technologies for reduction of production cost in swine industry. The labor that goes into the swine industry varies widely both in absolute amount and in the proportion of total cost that labor represents. In well-managed swine farms 7.9 to 8.5% of the total cost of producing hogs was the cost of the labor required by the farrowing-to-finishing enterprise. One of the marks of good organization and management of the enterprise is a low labor cost.

The farrowing is probably the most critical period, and at that time diligence will be most highly rewarded. Producers whose records consistently show a profit on their swine operations are repeatedly found to be attentive, exacting, and timely in work with their animals. Reproductive standards in swine are being raised because of economic pressures for lowered costs of production.

The biostimulation techniques offers a potentially useful and practical way to improve reproductive efficiency in livestock species. The understanding of the role of pheromones could be potential economic importance in addressing some of the problems associated with swine production.

Benefits of artificial insemination(AI) are more widespread use of genetically superior sires, both between and within herds and linked with estrous synchronization by pheromones, boar contact, hauling or moving stress plus boar contact, or exogenous estrogen treatment. Much effort has

been exerted to determine the conditions required to maintain motility and normal acrosome of boar sperm by various storage procedures, but the longest storage of diluted boar sperm thus far achieved until very recently without appreciable loss of motility and normal acrosome in four or five days.

Frozen-thawed boar semen gives adequate farrowing rates and litter size response for specialized situations, such as export/import, introduction of new bloodlines, and procurement of semen from boar of extremely high genetic merit. Unlike bull sperm, the sperm from boars cannot be readily frozen without loss of motility and fertility.

As scientists continue to search for improved methods of freezing boar sperm for long periods of storage, they are obtaining greater knowledge of sperm physiology, which will be of use in application of AI in commercial swine production in the future.

This study was aimed to find out the new porcine pheromonal compounds and the cold shock resistance sperm by endocrinological and cytological methods, and to analyse the productivity and economic feasibility by using of porcine pheromone and cold shock resistance sperm.

III. The Contents of the Research

The overall objective of this study is to develop boar pheromonal odorants for biostimulation control system technologies, to find out cold shock resistance sperm by endocrinological and cytological methods and to analyse productivity and economic feasibility by using of boar pheromone and cold shock resistance sperm. The contents of the research were as follows :

1. Qualitative analyses of structure determination of a pig sex attraction agents ; 5α -androst-16-en-3-one and 5α -androst-16-en-3-ol.
2. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: I. Ligand based molecular shape similarity of 5α -androst-16-en-3-one analogues and their physicochemical parameters.

3. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: II. Holographic QSAR model for binding affinities between ligands of volatile odorants molecules and porcine odorant binding protein(pOBP).
4. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: III. Comparative molecular field analyses(CoMFA) on binding affinities between ligand of 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofuran derivatives and porcine odorant binding protein.
5. Search of a pig pheromonal agents; A molecular dynamics simulation and virtual screening from salivary lipocalin of boar.
6. Prediction and synthesis of active tetrahydrofuranyloxycyclohexane analogues.
7. Verification experiment of predicted compound as pig pheromonal agents: Predicted toxicities and pheromonal character of tetrahydrofuranyloxycyclohexane analogues.
8. Effects of semen characteristics, frozen-thawed sperm viability and serum FSH, LH, estradiol-17 β and testosterone concentrations between breeds and among seasons in boars.
9. Analysis of membrane integrity and mitochondrial activity in fresh and cryopreserved boar sperm using flow cytometry.
10. Study on control mechanism of the intercellular Ca²⁺ in the fresh and frozen boar sperm using confocal imaging technique.
11. ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and fertilizing capacity by cold shock resistance sperm.
12. Economic analysis according to scale of Artificial Insemination Centers.

13. Analysis of productivity and economic feasibility by using of boar pheromone.
14. Analysis of productivity and economic feasibility by using of cold shock resistance sperm.

IV. Research Results

1. Fifty-five androstanone derivatives, which are isomer or analogous substrate molecules, 5 α -androst-16-en-3-one (S₁) of lipocalin as receptor of pig pheromones were calculated and discussed. And also, it is expected that the compounds of 5 α -androst-3,11,17-trione(S₂) and 4-androsten-19-ol-3,17-dione(S₅) will be able to substitute for 5 α -androst-16-en-3-one (S₁) as existing porcine pheromonal steroids.
2. The optimized holographic quantitative structure activity relationship (HQ SAR), comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) and comparative molecular field analysis (CoMFA) models between some odorants, tetrahydrofuranoxycyclohexane analogues and binding affinity constants ($p[Od.]_{50}$) for porcine odorant-binding protein (pOBP) as receptor of pig pheromones were derived and discussed.
3. From the analytical results of the atomic contribution maps of HQ SAR models and contour maps of CoMFA models, which may give us some valuable informations to the modification of odorants for effective binding affinity. The two higher binding affinity compounds (tetrahydrofuranoxycyclohexane:TFC-A & TFC-B), as a pig pheromonal agent in a thousand tetrahydrofurane analogues were predicted using the three QSAR models.
4. From the theoretical studies on flexibility of a loop in a pheromone binding protein from salivary lipocalin (1GM6) of boar with molecular dynamics simulation and virtual screening methods, the structural informations on the compound, AQ6060(Score: -38.1 Kcal/mol & Volume: 182Å³) as pig pheromonal agent were obtained.

5. The various toxicities for the highest binding affinitive compounds, TFC-A and TFC-B were predicted by TOPKAT program. The tetrahydrofuranlyoxycyclohexane (TFC-A) molecule with negative toxicities among them was synthesized. Gilts treated with the boar pheromone showed 20% higher estrous synchronization compared with gilts without the pheromone treatment.
6. When serum FSH concentrations were lower, semen volumes were higher, and when serum testosterone concentrations were higher, sperm motility and normal acrosome rate of frozen-thawed sperm were higher.
7. Depolarization-induced Ca^{2+} release and store-operated Ca^{2+} entry mechanism may be impaired in frozen sperm most likely due to the depletion of Ca^{2+} store during cryopreservation.
8. There were no breed differences for the ATP contents of fresh and frozen semen. However, large differences among boars were found. Compared with fresh semen, frozen-thawed semen gave significantly lower ATP values. High correlations were found between ATP content and sperm motility. Frozen boar sperm with more than 50% motility and normal acrosome can be used for artificial insemination.
9. The economic feasibility by using of boar pheromone and cold shock resistance sperm with superior economic traits was found through the cost-benefit analysis.

V. Implementation and Application

The biostimulation technique through pheromones will offer a potentially useful and practical way to improve reproductive efficiency and management in gilts. The frozen-thawed boar semen with cold shock resistance sperm will give adequate farrowing rates and litter size response for specialized situations, such as export/import and introduction of new bloodlines in herds from boars of extremely high genetic merit. Also, this study will be contributed to develop basic techniques for in vitro fertilization of oocytes and production of transgenic pigs.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of project -----	1
Section 1. Necessity of the project -----	1
1. Technical aspect -----	1
2. Economical & industrial aspect -----	2
3. Social & cultural aspect -----	3
Section 2. Objectives of the project -----	5
1. Overall objectives -----	5
2. Subtitle and year objectives -----	6
Chapter 2. Current status of the technology -----	7
Chapter 3. Research contents and results -----	8
Section 1. Qualitative analyses of structure determination of a pig sex attraction agents; 5 α -androst-16-en-3-one and 5 α - androst-16-en-3-ol -----	8
1. Introduction -----	8
2. Materials and methods -----	8
3. Results and discussion -----	9
4. Conclusion -----	11
Section 2. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: I. Ligand based molecular shape similarity of 5 α -androst-16-en-3-one analogues and their physicochemical parameters -----	12
1. Introduction -----	12
2. Materials and methods -----	12
3. Results and discussion -----	13
4. Conclusion -----	20
Section 3. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation	

	control system technologies: II. Holographic QSAR model for binding affinities between ligands of volatile odorants molecules and porcine odorant binding protein (pOBP)	21

	1. Introduction -----	21
	2. Materials and methods -----	21
	3. Results and discussion -----	24
	4. Conclusion -----	29
Section 4.	The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: III. Comparative molecular field analyses (CoMFA) on binding affinities between ligand of 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofuran derivatives and porcine odorant binding protein -----	30
	1. Introduction -----	30
	2. Materials and methods -----	31
	3. Results and discussion -----	34
	4. Conclusion -----	38
Section 5.	Search of a pig pheromonal agents; A molecular dynamics simulation and virtual screening from salivary lipocalin of boar -----	39
	1. Introduction -----	39
	2. Materials and methods -----	39
	3. Results and discussion -----	40
	4. Conclusion -----	44
Section 6.	Prediction and synthesis of active tetrahydrofuranoxycyclohexane analogues -----	45
	1. Introduction -----	45
	2. Materials and methods -----	45

3. Results and discussion -----	46
4. Conclusion -----	49
Section 7. Verification experiment of predicted compound as pig pheromonal agents: Predicted toxicities and pheromonal character of tetrahydrofuranyloxycyclohexane analogues -----	51
1. Introduction -----	51
2. Materials and methods -----	51
3. Results and discussion -----	52
4. Conclusion -----	53
Section 8. Effects of semen characteristics frozen-thawed sperm viability and serum FSH, LH, estradiol-17 β and testosterone concentrations between breeds and among seasons in boars -----	55
1. Introduction -----	55
2. Materials and methods -----	56
3. Results and discussion -----	58
4. Conclusion -----	63
Section 9. Analysis of membrane integrity and mitochondrial activity in fresh and cryopreserved boar sperm using flow cytometry -----	64
1. Introduction -----	64
2. Materials and methods -----	64
3. Results and discussion -----	66
4. Conclusion -----	69
Section 10. Study on control mechanism of the intercellular Ca ²⁺ in the fresh and frozen boar sperm using confocal imaging technique -----	70

1. Introduction -----	70
2. Materials and methods -----	70
3. Results and discussion -----	72
4. Conclusion -----	78
Section 11. ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and fertilizing capacity of cold shock resistance sperm -----	79
1. Introduction -----	79
2. Materials and methods -----	79
3. Results and discussion -----	81
4. Conclusion -----	84
Section 12. Economic analysis according to scale of Artificial Insemination Centers -----	85
1. Introduction -----	85
2. Materials and methods -----	85
3. Results and discussion -----	86
4. Conclusion -----	91
Section 13. Analysis of productivity and economic feasibility by using of boar pheromone -----	92
1. Introduction -----	92
2. Materials and methods -----	92
3. Results and discussion -----	96
4. Conclusion -----	97
Section 14. Analysis of productivity and economic feasibility by using of cold shock resistance sperm -----	98
1. Introduction -----	98
2. Materials and methods -----	98
3. Results and discussion -----	102

4. Conclusion -----	103
Chapter 4. Achievements and contribution -----	104
Chapter 5. Application of results -----	105
Chapter 6. Collection information of foreign science during the research -----	106
Chapter 7. References-----	107

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	1
제 1 절 연구개발의 필요성 -----	1
1. 기술적 측면 -----	1
2. 경제·산업적인 측면 -----	2
3. 사회·문화적 측면 -----	3
제 2 절 연구개발 목표 및 내용 -----	5
1. 총괄 연구개발 목표 -----	5
2. 세부 및 연차별 연구개발 목표 -----	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	7
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 -----	8
제 1 절 돼지 성 유인물질의 정성분석 및 구조확인: 5 α -androst-16-en-3-one과 5 α -androst-16-en-3-ol -----	8
1. 서 론 -----	8
2. 재료 및 방법 -----	8
3. 결과 및 고찰 -----	9
4. 결 론 -----	11
제 2 절 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새물질의 탐색: I. 5 α -androst-16-en-3-one 유사체들의 리 간드에 기초한 분자 유사성과 물리화학 파라미터 -----	12
1. 서 론 -----	12
2. 재료 및 방법 -----	12
3. 결과 및 고찰 -----	13
4. 결 론 -----	20
제 3 절 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새물질의 탐색: II. 휘발성 냄새분자의 리간드와 porcine odorant binding protein(pOBP) 사이의 결합 친화력에 관한 홀	

로그래피적 QSAR모델 -----	21
1. 서 론 -----	21
2. 재료 및 방법 -----	21
3. 결과 및 고찰 -----	24
4. 결 론 -----	29
제 4 절 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새물질의 탐색: III. 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofurane 유도 체와 porcine odorant binding protein 사이의 결합 친화력에 관한 비교 분자장 분석 -----	30
1. 서 론 -----	30
2. 재료 및 방법 -----	31
3. 결과 및 고찰 -----	34
4. 결 론 -----	38
제 5 절 돼지 페로몬 성 물질의 탐색: Salivary lipocalin으로부터 분자 동 역학적 모의실험과 virtual screening -----	39
1. 서 론 -----	39
2. 재료 및 방법 -----	39
3. 결과 및 고찰 -----	40
4. 결 론 -----	44
제 6 절 돼지 페로몬 성 물질의 예측과 Tetrahydrofuranyloxcyclohexane 유도체의 합성 -----	45
1. 서 론 -----	45
2. 재료 및 방법 -----	45
3. 결과 및 고찰 -----	46
4. 결 론 -----	49
제 7 절 돼지 페로몬 성 물질의 실증실험; Tetrahydrofuranyloxcyclohexane 유도체와 androstenone의 독성 예측과 페로몬 특성-----	51
1. 서 론 -----	51

2. 재료 및 방법 -----	51
3. 결과 및 고찰 -----	52
4. 결 론 -----	53
제 8 절 종모돈의 정액성상, 동결-융해후 정자의 생존성, 혈청중 FSH, LH, estradiol-17 β 및 testosterone 농도에 미치는 품종과 계절의 영향 -----	55
1. 서 론 -----	55
2. 재료 및 방법 -----	56
3. 결과 및 고찰 -----	58
4. 결 론 -----	63
제 9 절 원정액과 동결정액에서 유세포분류기를 이용한 정자세포의 세포막 완전성과 미토콘드리아 활성의 분석 -----	64
1. 서 론 -----	64
2. 재료 및 방법 -----	64
3. 결과 및 고찰 -----	66
4. 결 론 -----	69
제 10 절 원정액과 동결정액의 Confocal Imaging 기술을 이용한 정자내 Ca 이온 조절기전 구멍 -----	70
1. 서 론 -----	70
2. 재료 및 방법 -----	70
3. 결과 및 고찰 -----	72
4. 결 론 -----	78
제 11 절 원정액과 동결-융해정액의 정자내 ATP함량과 내동성 정자의 수정능력 -----	79
1. 서 론 -----	79
2. 재료 및 방법 -----	79
3. 결과 및 고찰 -----	81
4. 결 론 -----	84

제 12 절	인공수정센터의 적정규모와 경제성 분석-----	85
1. 서론	-----	85
2. 재료 및 방법	-----	85
3. 결과 및 고찰	-----	86
4. 결론	-----	91
제 13 절	응성페로몬 이용시 생산성 향상 효과 및 경제적 타당성 분석 -----	92
1. 서론	-----	92
2. 재료 및 방법	-----	92
3. 결과 및 고찰	-----	96
4. 결론	-----	97
제 14 절	내동성 정자 이용시 생산성 효과 및 경제적 타당성 분석--	98
1. 서론	-----	98
2. 재료 및 방법	-----	98
3. 결과 및 고찰	-----	102
4. 결론	-----	103
제 4 장	목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	104
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	105
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	106
제 7 장	참고문헌 -----	107

제 1장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

시그널링 페로몬(signaling pheromone)과 프라이밍 페로몬(priming pheromone)이란 화학물질들은 동물의 성행동, 번식조절 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 웅성 페로몬 (male pheromone)은 암컷의 성 성숙을 유발시키고 (Brooks와 Cole, 1970; Karlbom, 1982; Kirkwood 등, 1981; Pearce와 Paterson, 1992), 발정주기에 영향을 주며 (Booth와 Baldwin, 1983; Mora 등, 1994; Schank 등, 1997), 발정행동 (Both, 1980; Dorries 등, 1997; McGlone과 Morrow, 1988)과 분만 및 분만간격 (Hillyer, 1976)에 영향을 준다고 보고하였다. 또한 뇨, 타액, 분, 질분비물이나 피부분비물에는 동물의 행동에 영향을 주는 여러 종류의 페로몬들이 있다는 연구보고가 있었다 (Booth, 1982; Booth와 Signoret, 1992; Signoret, 1970).

지금까지 화학적으로 정제된 포유동물의 페로몬은 porcine 5 α -androstenone (5 α -androst-16-en-3-one)과 5 α -androstenol (5 α -androst-16-en-3-ol)이 있으며, 이 페로몬 물질들은 비강 (nasal cavity)의 비점막을 통해서 혈액속으로 흡수되어 시상하부와 뇌에 전달되어 기능을 발휘하는 것으로 알려졌다. 그러나 후각계통 (olfactory system)을 통한 페로몬 물질에 대한 감지정도가 종빈도에 따라 다르다는 것이 알려졌다 (Kathleen 등, 1995), 종빈도의 반응에 미치는 페로몬의 양과 질에 대해서는 아직 구명되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 종모돈의 뇨와 타액에서 페로몬 물질에 대한 정성 및 정량분석을 통해 새로운 페로몬 물질을 개발하고 확실한 발정동기화 모델을 제시하고자 한다.

한편 우리 나라의 인공수정 보급율은 1994년 3%이던 것이 2002년 말 현재 50%로 증가하였으며 상업용 돼지 인공수정센터가 45개소로 늘어나는 등 급격하게 발전하였고 앞으로도 더욱 증가할 것으로 예상된다. 현재 액상정액 희석액으로 BTS (Beltsville thawing solution) 희석액이나 Androhep 희석액이 일반적으로 사용되고 있으며 정자운동성이 90% 이상인 원정액인 경우 채취 후 희석하여 3~5일까지 보존사용이 가능하다. 동결정액의 경우 Lactose-egg yolk (LEY) 희석액이 사용되고 있다.

분만율과 산자수에 있어서 액상정액을 이용한 인공수정과 자연종부와는 비슷한 경향을 나타내나, 동결정액을 이용한 인공수정시 분만율은 20~30%, 산자수는 2~3두 정도 낮은 실정이다. 우수한 종모돈들 중에서 내동성있는 정자를 생산하

는 종모돈은 약 50%정도에 불과하며 내동성있는 정자가 액상정액에서도 보존성이 강하다. 앞으로 인공수정을 통한 종모돈의 생산비를 절감하고, 우량종모돈의 이용을 확대 보급시키며, 첨단생명공학의 발전을 위해서는 내동성 정자를 생산하는 우량 종모돈의 내분비학적 및 세포학적 특성을 구명하고 희석액을 개발하여 동결정액을 실용화할 때 양돈산업의 국제경쟁력을 제고시킬 수 있다.

Cheon 등 (2002)은 듀록 종모돈에서 혈청 테스토스테론 농도가 높을수록 동결-융해 후 정자의 생존성이 높다는 것을 발표하였는바, 앞으로 정자의 내동성과 내분비 계통과의 관계는 더 깊이 연구할 필요가 있다. 동결-융해시 정자의 생존성에 관해서는 많은 학자들에 의하여 연구되어왔다. 그러나 아직도 동결-융해시 정자의 손상에 대한 정확한 기전과 내동성 정자의 구명에 대해서는 아직도 분명히 밝혀지지 않았다 (Leeuw 등, 1990). 동결시 정자의 형태적 변화로는 세포막 성분의 누출, 침체 및 미토콘드리아의 손상을 들 수 있고, 생화학적 변화로는 정자내로 Na, Ca 이온의 유입과 K, Mg 이온의 정자외로 유출시키는 것이다. 그 외에 효소와 phospholipid의 방출, ATP 수준과 운동성의 감소, DNA의 퇴화 등을 들 수 있다.

이상의 동결시 정자의 형태적 생화학적 변화는 정자의 세포막과 밀접한 관계가 있다. 따라서 여기에서는 내동성 정자와 비내동성 정자의 세포학적 구명을 통하여 우량 종모돈의 동결정액 제조에 응용하고자 한다.

지금까지 언급한 페로몬 개발, 내동성 정자생산 종모돈의 내분비학적 기전 및 정자의 세포학적 연구는 단편적으로 이루어져온바, 종합적인 연구가 수행될 때 연구의 성과와 양돈산업의 국제 경쟁력을 극대화할 수 있을 것이다.

2. 경제 · 산업적 측면

국내 사육 모돈수는 2002년 9월 현재 (농협조사월보, 2002년 10월) 956,000두이며, 비육돈 출하두수는 1,319,000두/월이다. 100 kg 출하시 까지의 비육돈 생산비는 151,000원이다. 이 경우 음성 페로몬을 이용한 발정동기화를 시도하여 생산비를 5%만 절감시킬 수 있다고 가정할 때 비육돈 1두 당 7,550원의 생산비를 절감할 수 있다. 연간 비육돈 출하두수는 15,828,000두 (1,319,000두/월×12월)로 가정할 때 연간 약 120억원의 생산비를 절감할 수 있다. 양돈장의 수익은 판매가격을 얼마나 잘 받는가 하는 것과 생산비용을 얼마나 절감하느냐에 달려있다.

내동성 정자생산 우수종모돈에서 생산한 정자를 이용한 인공수정은 판매가격을 잘 받는 것 이외에 번식성적 및 산육성적을 개선하여 얻는 비용 절감 효과를 매우 크게 할 수 있다. 비용절감 요소중 사료비와 출하일령을 5%만 개선한다 하여도 아래표와 같이 비육돈 1두당 5,900원의 생산비를 절감 할 수 있다.

구 분	사 료 비	출 하 일 령
개 량 전	비육돈 1두당 90,000원	출하체중 도달일령 180일
개 량 도	5%	
개 량 효 과	비육돈 1두당 사료비 4,500원 절감	출하일령 9일 단축 사육비 1,400원 절감
산 출 근 거	※ 출하체중 : 110 kg ※ 사료효율 : 2.7 ※ kg당 사료비 : 300원	※ 위탁사육비 : 17,000원 ※ 사육기간 : 110일 ※ 1일 사육비 : 155원

인공수정 보급율 25%일 경우 사료비와 출하일령 2가지만 5% 개선한다 하여도 연간 230억, 보급율 75%일 경우 700억의 개량효과를 나타낼 수 있으므로 내동성 정자생산 우수 종모돈에서 생산한 정자를 이용한 개량의 효과는 천문학적인 금액이 될 것이다.

인공수정 보급율	유 전 적 개량금액	비 육 돈 출하두수	국내양돈산업의 개 량 화
25%	5,900원 (비육돈 1두당 출하일령+사료비 5% 개선)	396만두	233억
50%		792만두	467억
75%		1,188만두	701억
※ 비육돈 출하두수 - 분만율 75%, 분만 복당 출하두수 8두 - 교배복당 출하두수 = 교배두수×분만율×분만복당 출하두수			

3. 사회·문화적 측면

세계 양돈산업에 영향을 미칠 수 있는 여러 가지 핵심요인으로는 무역자유화, 경제, 돼지질병, 환경, 식품안전, 노동력, 동물복지, 토지사용 가능여부 및 정치 등을 들 수 있다. 이 요인들이 모두 영향력을 대변한다고 할 수는 없으나, 전세계 양돈 경쟁국들 사이에 서열이 바뀌고 있다. 일부 돈육 수출국가들은 수출여력의 한계에 도달하고 있으며, 아시아 국가들은 잠재력이 큰 시장으로 떠오르고 있다.

현재 우리 나라는 일본이라는 세계 최대의 돈육수출시장을 가지고 있다. 그러나 2000년 3월 25일 우리 나라에서 구제역이 발생하므로써 3월 27일부터 일본으로의 돼지고기 수출이 전면 중단되었다. 다행히도 2001년 9월 19일 국제수역사무국 (OIE)으로부터 구제역 청정국으로 인정받았다. 그러나 현재 일본 수출시장을 점유하고 있는 캐나다, 덴마크, 멕시코, 유럽연합 및 미국의 수출 물량을 뺏아오려면 분명히 두 가지 방법밖에 없다. 하나는 우리 나라에서 생산되는 돼지고기의 품질이 월등히 우수해야 한다는 점과 또 하나는 수출가격이 이들 경쟁국보다 월등히 싸야한다는 점이다. 이와 같은 시점에서 종빈돈 번식효율 증진을 위한 웅성 페로몬 개발과 내동성 정자를 생산하는 우량종모돈의 내분비학적 및 세포학적 구멍과 동결정액의 실용화는 양돈산업의 국제경쟁력 향상을 위해 절실히 요구되고 있다.

제 2절 연구개발 목표 및 내용

1. 총괄 연구개발 목표

본 연구는 종모돈의 뇨와 타액에서 페로몬 물질에 대한 정성 및 정량분석을 통하여 새로운 페로몬 물질을 개발하고, 내동성 정자를 생산하는 우량 종모돈의 내분비학적 기전과 내동성 정자의 세포학적 특성 구명과 동결정액 실용화를 통해서 양돈산업의 생산성을 향상시키고자 한다.

기술 항목별 목표

- 가. 종모돈의 뇨 및 타액중에서 성 유인 물질에 대한 정성 및 정량분석
- 나. 종모돈의 뇨 및 타액중에서 성 유인 물질에 대한 분리 및 구조확인
- 다. 유인물질 탐색 및 실증실험
- 라. 유인물질의 특허획득
- 마. 종모돈의 품종 및 계절별 FSH, LH, testosterone 및 estradiol 분석과 정자의 내동성 검사
- 바. 내동성 및 비내동성 정자의 동결 용해시 세포막 성분의 누출, 침체 및 미토콘드리아의 손상구명
- 사. 정자내 Na, Ca 이온의 유입과 K, Mg 이온의 정자의 유출구명
- 아. 내동성 및 비내동성 정자의 효소, phospholipid, ATP 및 DNA 변화구명
- 자. 내동성 및 비내동성 정자의 동결정액 실증시험
- 차. 종돈 및 인공수정 센터의 적정규모와 경제성 분석
- 카. 옹성페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 계측과 우리 양돈산업의 국제 경쟁력 비교분석
- 타. 개발기술을 이용한 돈육시장의 차별화 전략개발

2. 세부 및 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위	연구개발의 결과
1차년도 (2003-2004)	충남대학교 (성낙도) 웅성페로몬 물질의 탐색 및 응용	· 종모돈의 뇨 및 타액 중에서 성유인 물질에 대한 정성 및 정량분석	성유인 물질 구명
	충남대학교 (박창식) 내동성 정자생산 종모돈의 내분비 및 세포학적 기전구명과 실용화	· 종모돈의 계절별 및 품종별 FSH LH, testosterone 및 estradiol 분석과 정자의 내동성 검사	내동성 정자생산 종모돈 호르몬 수준 구명
	충남대학교 (김철호) 웅성페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 분석	· 기술 개발의 경제적, 산업적 효과 분석을 위한 모형의 개발 및 분석. 종돈 및 인공수정 센터의 적정규모와 경제성 분석	기술개발 모형개발
2차년도 (2004-2005)	충남대학교 (성낙도) 웅성페로몬 물질의 탐색 및 응용	· 종모돈의 뇨 및 타액 중에서 성유인물질에 대한 분리 및 구조 확인	성유인물질 합성
	충남대학교 (박창식) 내동성 정자생산 종모돈의 내분비 및 세포학적 기전구명과 실용화	· 내동성 및 비내동성 정자의 동결 용해시 세포막 성분의 누출, 침체 및 미토콘드리아의 손상구명 · 내동성 및 비내동성 정자의 정자내 Na, Ca 이온의 유입과 K, Mg 이온의 정자의 유출 구명	내동성 정자의 세포학적 기전 구명
	충남대학교 (김철호) 웅성페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 분석	· 웅성페로몬 및 내동성 정자의 이용을 통한 생산성 향상 효과의 계속 모형 개발. 종돈 및 인공수정 센터의 적정 규모와 경제성 분석	생산성 향상 효과 모델 개발
3차년도 (2005-2006)	충남대학교 (성낙도) 웅성페로몬 물질의 탐색 및 응용	· 성유인 물질의 탐색 및 실증시험	특허 출원 및 능가보급
	충남대학교 (박창식) 내동성 정자생산 종모돈의 내분비 및 세포학적 기전구명과 실용화	· 내동성 및 비내동성 정자의 효소, phospholipid, ATP 및 DNA 변화 구명 · 내동성 및 비내동성 정자의 동결 정액의 실증 시험	내동성 동결정액 제조 및 특허출원
	충남대학교 (김철호) 웅성페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 분석	· 웅성페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 계속과 우리 양돈 산업의 국제 경쟁력 비교분석 · 본 연구에서 개발된 기술을 이용하여 생산된 우량돈의 시장 차별화 전략개발. 종돈 및 인공 수정 센터의 적정규모와 경제성 분석	연구개발 결과에 따른 종돈 및 인공수정 센터의 경제성 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

시그널링 페로몬과 프라이밍 페로몬 물질들은 돼지의 성행동, 번식조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며 그 연구결과들은 다음과 같다.

연도	연구자	기술 개발 내용
1970	Brooks와 Cole	웅성 페로몬은 암컷의 성성숙 유발
1976	Hillyer	분만과 분만간격
1982	Booth	악하선 타액에서 페로몬 물질 구명
1983	Booth와 Baldwin	페로몬은 암컷의 발정주기에 영향
1988	McGlone과 Morrow	성성숙후의 발정행동
1995	Kathleen 등	후각계통을 통한 종빈돈의 페로몬 물질의 감지

지금까지 내동성 정자생산과 종모돈의 호르몬 농도와의 관계를 밝힌 논문은 없었으며, Cheon 등 (2002)은 듀록 종모돈에서 혈청 테스토스테론 농도가 높을수록 사계절 모두에서 동결-융해 후 정자의 생존성이 높다는 것을 발표하였다.

돼지 정자는 특히 급속동결에 의하여 손상을 받기 쉽다는 Polge (1956)의 보고 이래 많은 학자에 의해서 동결-융해 후 정자의 손상에 관하여 아래와 같이 많은 연구가 수행 되어왔다.

연도	연구자	기술 개발 내용
1978	Pursel 등	동결정액의 동해방지제로 OEP 사용
1981	Watson	동결시 정자세포막에 미치는 영향 구명
1985	Pursel과 Park	돼지 동결정액의 최적 동결-융해 과정 구명
1989	Canvin과 Buhr	온도가 돼지 정자의 세포막의 유동성에 미치는 영향
1990	De Leeuw 등	동해로 인한 세포막 손상기전 구명
1991	Cox 등	돼지 정자 세포막의 이온경로 구명
1995	Buhr와 Pettitt	동결-융해 후 정자 세포막의 지질교환 구명
1997	Maxwell과 Johnson	동결정액 보존시 정자의 세포막 상태 구명
1998	Pettitt와 Buhr	동결 희석액의 조성과 계면활성제가 정자 기능과 세포막 형태에 미치는 영향 구명

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 돼지 성 유인성 물질의 정성분석 및 구조확인 : 5 α -androst-16-en-3-one 및 5 α -androst-16-en-3-ol

1. 서 론

돼지의 화학적인 신호가 타액에 의하여 전달된다는 사실(Gower 등, 1986)에 근거하여 이를 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 시도의 일환으로 돼지 음성 페르몬성 대체 물질을 탐색하고 개발하기 위하여 특히, 5 α -androst-16-en-3-one 및 이의 iso-form인 환원된 형태의 화합물, 5 α -androst-16-en-3A-ol 등과 같은 스테로이드 페로몬들이 여성에게 페로몬들처럼 행동하게 한다는 징후들에 관한 보고(Melrose 등, 1971; Reed 등, 1974)에 주시하였다. 수년 전에 음성 돼지의 타액으로부터 정제된 이 페르몬성 화합물들과 단백질들이 결합되어 있다고 보고되었다(Booth, 1984; Gower 등, 1986; Booth 등, 1988). 이 pheromaxeins 이라고 불리는 15 kDa 정도의 폴리펩티드에 관련한 화합물은 거세당하지 않은 음성 돼지의 성숙한 하악선(submaxillary glands)에서 분비된다고 알려졌다.

현재, 돼지의 발정 동기를 유발하는 방법으로는 Altrenogest(Regumate 또는 Altrenogest; 17 α -allyl-17 β -hydroxyestra-4,19, 11-trien-3-one), PG600(eCG 및 hCG 혼합물) 및 돼지 페로몬 스프레이(SOA) 등, 3 가지를 사용하는 방법들이 사용되고 있다. 그러나 이 중에서 돼지 페로몬 스프레이(SOA)의 유효물질이 5 α -androst-16-en-3-one 및 5 α -androst-16-en-3-ol 그리고 Altrenogest 등이 steroid 계통 화합물로서 유기합성의 어려움으로 인하여 수급이 용이하지 못하다. 그러므로 더욱 효율적인 페로몬성 대체물질을 탐색하기 위하여 여기에서는 돼지 하악선의 추출물로부터 이들 화합물들의 존재를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

추출물의 정제; 음성 돼지의 하악선에서 채취한 정제되지 않은 추출물은 Polytron homo- geniser를 사용하여 20분간 20000xg에서 원심분리와 2 vol. 20 mM Tris/HCl, pH 7.4 (Tris buffer)에서 균질화를 실시하여 만들었으며 표면액은 다음 분별 단계에서 사용하였다. 추출물 50 ml을 1.5cm*25 cm 와트먼 CM-52 column을 통하여 크로마토그래피를 실시하였다. 용리는 20 mM Tris/HCl

(pH 7.4)에서 0에서 0.5 M까지 NaCl의 linear gradient를 사용하여 이루어졌으며 각각의 부분은 12% SDS/PAGE에 의해서 분석되었다. 분석용 시료는 흐름 속도 (1 ml/min)의 0.1% trifluoroacetic acid 조건에서 2%-60%까지 acetonitrile의 linear gradient로 추출되었고 크로마토그램상에 하나의 피크가 나타났다. 전기영동은 상법(Laemmli, 1970)에 따라 1% SDS 존재하에서 12% 폴리아크릴아미드 겔을 사용한 Bio-Rad Mini-Protean II 장치를 사용하여 실시하였다.

전기분무 질량 분석법: 정제된 단백질 시료들의 HPLC는 전기분무 질량 분석법(ES/MS)에 의해서 분석되었고 Bio-Q 3배 사중극자 질량 분석계(Micromass)를 사용하였다. 단백질 용액의 분취량(10 μ l)은 10 μ l/min의 흐름 속도에 이온 원으로 주사되었다. 질량 분석계는 10 s/scan 조건에서 m/z=800에서 m/z=1800까지 조사되었고 3.5kV의 cone voltage와 50 V의 orifice voltage를 사용하여 시료들이 조각나지 않는 상태에서 관찰되었다. 질량 검정은 분리된 myoglobin(평균 분자질량 16951.5 Da)의 분리 injecton으로부터 다중 하전된 이온들에 의하여 수행되었다.

질량 스펙트럼 분석: 단백질과 회합된 작은 리간드들의 분석을 위하여 시료들은 디클로로메탄으로 실온에서 추출되었고 용액은 적은 부피까지 증발시켰다. GC/MS 분석은 TRIO 2000 모델의 질량 분석계(Micromass)로 연결된 모세관 컬럼 SPB-1(30 m \times 30.25 mm 내부직경, 0.25 μ m 및 막 두께, Supelco)으로 설비된 GC 8000 가스 크로마토그래프로 실행하였다. 건조한 시료는 1-2분 동안, 실온에서 diazomethane 50 μ l과 함께 유도되었고 질소기체 흐름속에서 건조되었다. 시료는 디클로로메탄 10 μ l에 녹이고 1 μ l은 분석을 위해서 분취되었다. 분석 조건은 (주입기 온도, 250 $^{\circ}$ C; 이온 원 온도, 200 $^{\circ}$ C; GC/MS 경계면 260 $^{\circ}$ C) 분당 2.5 $^{\circ}$ C에서 60 $^{\circ}$ C에서 280 $^{\circ}$ C까지 GC column의 온도를 상승시켰다. ES 질량스펙트라는 70eV 이온화 퍼텐셜에 0.08초 interscan 시간과 0.6초의 스캔시간을 사용한 50-450 질량 범위에서 스캐닝하여 기록되었다.

3. 결과 및 고찰

단백질 정제와 특성: 돼지 하악선으로부터 정제하지 않은 추출물의 전기영동적 특성을 Fig. 1에 나타내었다. (B) 수태지 하악선으로부터 20-kDa의 Superose 12에서 Gel 여과법으로 cation-exchange chromatography 후에 농축되었다. Fraction(분류)는 12% SDS/PAGE에 의해 분석되었다. 겔 여과법 실험은 칼럼을 분석하기 위해 알려진 분자 질량의 단백질을 사용하여 결정함으로써 약 35 kDa

의 조건에서 분자질량에 대한 정보를 제공한다. 띠의 group에 관계된 단백질 중의 정제는 다른 오염물질로부터 거의 정제된 단백질을 포함하는 CM-52 합성수지에서 표준 크로마토그래피로 수행되었다. 전기영동 분석은 폭넓은 띠를 보여주고 폐색기구 시험에서 그것은 3개의 명백한선으로 나타났다(Fig. 1).

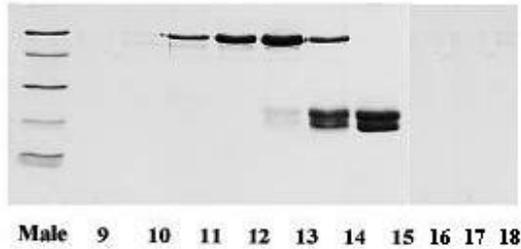
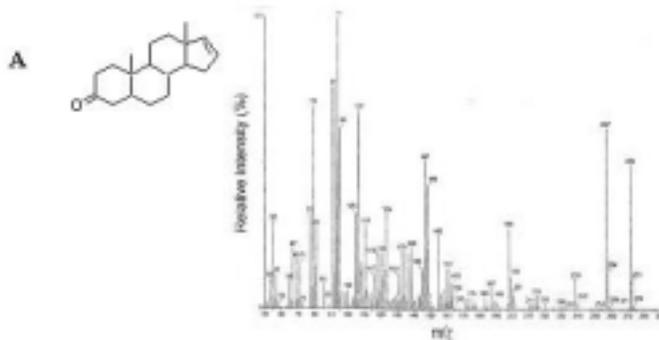


Fig. 1. Purification of salivary proteins from male (M) pig submaxillary glands by gel electrophoresis

성 유인성 물질의 확인: 돼지 하악선으로부터 분리 정제된 단백질 시료들은 dichlorome - thane으로 추출하였고 추출물은 GC/MS로 분석되었다. Gas chromatogram에서 2개의 큰 피크는 두 화합물의 mass spectra를 비교한 결과, 5 α -androst-16-en-3-one(MS: m/z(%), (M⁺274), 94(100)와 5 α -androst-16-en-3 α -ol(MS: m/z(%), (M+2, 276), 94(100))인 것으로 확인되었다.



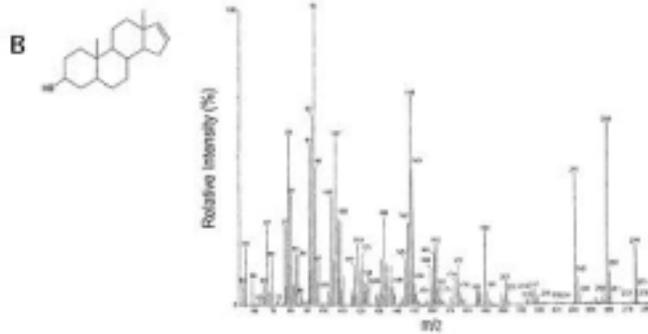


Fig 2. Electron impact mass spectra for the ligands of lipocalin (SAL) determined by GC-MS; 5 α -androst-16-en-3 β -ol (A, M.Wt.; 274) and 5 α -androst-16-en-3-one(B).

4. 결 론

단백질 시료의 전기영동은 폴리펩타이드 분자의 질량이 20k Da 근처에서 넓게 분포되어 있었으며 정제된 단백질 시료로부터 얻은 GC/MS 스펙트라는 분석 결과, 5 α -androst-16-en-3-one와 환원형 이성체인 5 α -androst-16-en-3 β -ol 인 것으로 판단되었다. 따라서 이들 화합물들이 생물학적 자극통제 수단으로 활용할 수 있는 돼지 음성 페르몬성 화합물임을 확인하였다.

제 2 절 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색; I. 5 α -androst-16-en-3-one 유사체들의 리간드에 기초한 분자 유사성과 물리 화학 파라미터

1. 서 론

근래 가축들의 생산과 수요를 조절하기 위한 “control system technologies”의 수단으로 생물학적인 자극과 페로몬들의 역할(Rekwot 등, 2001)에 관련된 연구가 활발하게 시도되고 있다. 이러한 맥락에서 돼지를 포함한 포유동물의 페로몬과 냄새 성분(Buck, 2000)을 감지하는 경로(Krzymowski 등, 1999)와 수용체(Pantages 등, 2000 및 Buck 등, 1991)들에 관한 연구 뿐만 아니라, 돼지 후각에 의한 음성 페로몬 성분인 androstenone의 감지 정도(Dorries 등, 1995)에 관한 연구는 물론, 상품화(PBS)된 boar pheromon spray (SOA)를 사용한 결과, 재생산 효율이 개선되었다는 평가에 관한 연구도 보고된 바(Shrestha 등, 2001) 있다.

본 연구에서는 새로운 돼지 페로몬성 물질을 탐색하여 생물학적 통제 수단으로 활용하기 위하여 porcine nasal tissues 중에 존재하는 페르몬의 수용체로 알려진 lipocaline과 결합하는 것으로 추정되는(Gower 등 1982) 기질분자, 5 α -androst-16-en-3-one(S1)와 5 α -androst-16-en-3-ol (S11)의 리간드에 기초하여 총 54개에 달하는 androstanone 유도체들의 분자 유사성 지수(Meyer 등, 1991)를 포함한 9종의 다양한 물리-화학 파라미터들을 계산하고 실증 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

유사성 지수계산: 돼지 음성 페로몬 S1과 S11을 기초하여 총 54개의 이들 유사체들이 분자구조를 SYBYL 6.6 (1999) program 중 simulated annealing 방법으로 형태를 탐색 (cycle: 10, temperature: gradient convergence value를 가지는 Tripos force field와 Powell gradient algorithm 및 Gasteiger-Huckel charge를 사용하여 최적화 하였다(Desiraju 등, 2002). 그리고 최적화된 형태를 superimpose 방법으로 3차원 공간상에 정렬 (alignment)한 후, 각 분자들의 중첩 부피를 구하여 Meyer와 Richard(1991)가 보고한 바에 따라 분자 유사성 지수(S)를 계산하였다.

Table 1. Symbols and definitions of used physicochemical parameters

Symbols	Definitions
MV (\AA^3)	Van der Waals bulk of organic compounds calculated by grid approximation.
Energy	The most stable energy of a molecule by stabilization gained from minimization (kcal/mol).
HF ^{a)}	The heat absorbed during the formation of one mole of a compound from its component elements in their most stable forms.
IP (eV)	The amount of energy required to split a chemical into electrically charged particles. Ionization potential is measured in units called electron Volts.
Lipole	The lipole of a molecule is a measure of the lipophilic distribution. it is calculated from the summed stomic logP values, as dipole is calculated from the summed partial charges of a molecule.

^{a)}Heat of Formation (Kcal).

물리화학 파라미터의 계산: Sybyl 분자 모델링 프로그램 (Ver. 6.91)으로 기질 물질과 유사체들을 최적화하여 가장 안정한 3차원 구조를 정한 다음에 이들 54개의 유사체들을 대상으로 분자량 (MWt: amu), 소수성 (logP), 몰라 굴절을 (MR: molar refraction; cm^3/mol), van der Waals 분자 표면적 (SA: molecular surface area; \AA^2), van der Waals 분자부피 (MV: molecular volume; \AA^3), HOMO, LUMO energy (ev.), 생성열 (HF: heat of formation; Kcal), 이온화 포텐셜 (IP: ionization potential; ev.), 분자 리폴 (lipole) 및 쌍극자 능율 (DM: dipol moment; Debye) 등의 물리-화학 파라미터들을 계산하고 여기에서 이용된 파라미터들의 정의를 Table 1에 요약하였다. 또한, SA와 lipole은 TSAR (Oxford molecular) 프로그램 (Ver. 3.3)으로 각각 계산하여 총 13종의 물리-화학 파라미터들을 얻었다. 그리고 여러 가지 물리화학 파라미터와 유사성 지수 (S)와의 상관관계는 TSAR 프로그램을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

분자구조 유사성; Androsterone은 음성 hormone인 testosterone의 대사물로서 돼지웅성 페르몬, 5 α -androst-16-en-3-one (S1)과 3-one grpup이 환원된 5 α -androst-16-en-3-ol (S11)에 대한 수용체로 존재하고, 기질 분자인 페르몬 성분은 porcine nasal tissues 중에서 수용체인 lipocaline과 반응하는 것으로 알려져

있으며 androstanone계 화합물은 체내에서 대부분 cholesterol로부터 합성된다. 이들 S1과 S11에 대한 androstanone 유도체들의 유사성 지수(S; similarity indice)를 구하기 위하여 최저 에너지를 가지는 가장 안정한 형태는 simulated annealing 방법으로 Gasteiger- Huckel charge와 0.05kcal/mol 에너지를 단계적으로 변화시키면서 얻은 다음에 superimpose 방법으로 3차원 공간상에 정렬한 후(Fig. 2), 중첩부피를 구하였다. 이때 기질분자, 5 α -androst-16-en-3-one (S1)를 기준으로 삼아 다음, (1)식으로 계산(Meyer 등, 1991) 하였다. 여기에서 T₁ 및 T₁₁은 steroid 유도체와 기질분자, S1 각각의 부피이고 C는 중첩시 두 분자가 공통적으로 겹치는 common volume (Å³)이다. S-값은 0.0~1.0 사이의 값을 갖으며 중첩정도를 나타내는 것으로 1에 가까운 값일수록 두 구조가 흡사함을 나타낸다. 그러므로 비유사성(dissimilarity)은 D=1-S로 계산되며 D는 chirality coefficient의 shape analog이다.

$$S=C/(T_1XT_{11})^{\frac{1}{3}} \quad (1)$$

Table 2 및 3에는 기본 골격인 steroid 핵, perhydrocyclopentanphenanthrene 과 cholesterol을 위시하여 옹성 홀몬 및 돼지 페르몬과 그 유사체들을 망라하여 총 55개의 steroid 유도체들(1~53 및 S1~S5)의 분자구조 유사성 지수(S)는 물론, 9종의 다양한 물리-화학 파라미터들을 계산하여 정리하였으며 이들 파라미터들의 정의는 전보(Sung 등, 2003)와 같다. 이들 자료들로부터 화합물 대부분의 S-값들이 1.0에 가까운 수치를 나타내므로 이들 화합물들은 입체적으로 매우 유사함을 설명하고 있다. 그러나 androstanone 유도체들의 기본 골격인 steroid 핵 (54)과 cholesterol (55)의 유사성 지수들을 다른 유도체들과 비교한 바, steroid 핵(S=0.956)은 유사성이 큰 반면에 cholesterol(S=0.803)은 유사성이 크지 않았다. 따라서 Table 2에는 기질분자, S1과의 비교에 의하여 얻은 유사성 지수를 가지는(S=1.0) 4개의 화합물, 5 α -androstan-3,11,17-trione (S2), 4-androsten-11 β -ol-3,17-dione (S3), 4-androsten-17 β -ol-3,11-dione (S4) 및 4-androsten-19-ol-3,17-dione (S5) 등을 정리하였다. 이들은 모두 기질분자, S1과 거의 동일한 입체적인 구조 특성을 가지므로 S-값의 측면에서 기질분자와 유사한 생리활성을 나타낼 것으로 예상된다. 이 같이 S-값에 기초한 입체적 특성을 확인하기 위하여 Fig. 2에는 이들 화합물들의 최적화된 구조를 3차원 공간상에 정렬한(alignment) 바 cyclopentane 고리 부분을 제외하고 대체로 잘 일치함을 알 수 있다. Table 3에는 (S11)에 대한 유사성 지수를 가지는 화합물들을 정리하였다.,

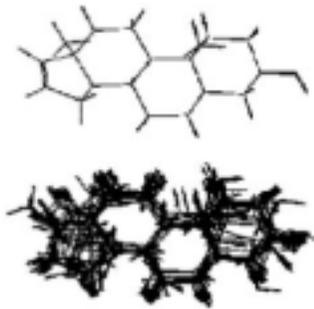


Fig. 2. The alignment for potential energy minimized conformers of 5-androst-16-en-3-one, (above) and selected analogues (below).

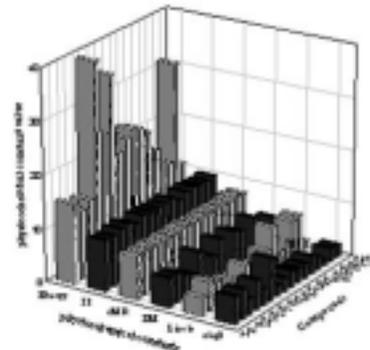


Fig. 3. Comparison of various physicochemical parameters for 5-androst-16-en-3-one and their 17 analogues.

물리-화학 파라미터; 돼지 음성 페로몬성 물질인 5 α -androst-16-en-3-one (S1)이 nasal tissues 중에서 수용체인 lipocaline과 결합하는 데에는 소수성(logP)이 가장 큰 영향을 미칠것으로 예측된다. 왜냐하면, 소수성은 기질분자가 생체 내에서 흡수와 이동에 큰 영향을 미치며 수용체와 반응하는데 있어서 가장 중요한 성질중의 하나이기 때문이다. 기질-수용체간의 반응은 “lock & key”의 논리에 따라 입체성은 물론, 소수성적인 성질과 전자 전달효과에 따르며 소수성 (lipophilicity)은 주로 분자의 크기와 이온화(ionization) 정도 및 수소 결합성에 의존적(Kansy 등, 1996)이다.

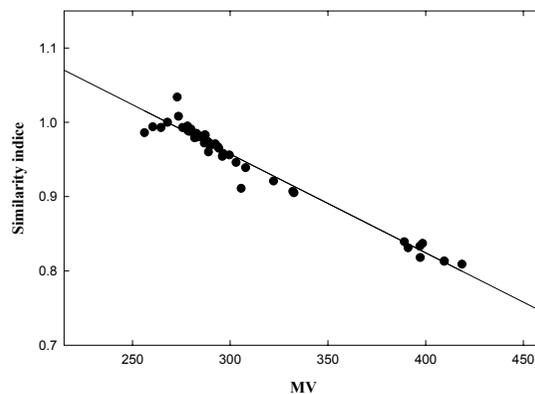


Fig. 4. Relationship between molecular similarity indices and molecular volume (MV) of 5 α -androst-16-en-3-one (S1) (A) analogues.

Table 2, 3에는 55개 androstanone 유도체들의 소수성(logP)은 물론, 분자량 (MWt), 몰라 굴절율(MR), 분극율(Pol,) van der Waals 분자 표면적(SA), van der Waals 분자 부피(MV), 수화 에너지(HyE) 및 쌍극자 능율(DM) 등, 9종의 물리-화학 파라미터들을 계산하여 정리하였다. 그리고 Table 3에는 S=1.0인 5개의 androstenone 분자들(S1~SI-4)을 정리하였는데 기질분자, S1을 제외하고 공통적으로 분자량이 302.41(amu)을 가지는 이성질체들이다. 모든 화합물을 대상으로 유사성 지수, S-값과 다른 물리-화학 파라미터와 1차식의 관계를 검토한 바, logP, HyE 및 DM과는 아무런 상관성이 없었으나 MWt, MR, Pol, SA 및 MV 등, 상수와 상관계수, $r^2=0.90$ 이상을 상회하는 높은 상관성 나타내므로서 입체적인 요소와 연관성이 있는 분자량, van der Waals 분자 표면적 및 van der Waals 분자부피($S(S1)=-1.33 \times 10^{-3} (\pm 3.09 \times 10^{-5}) MV + 1.356 (\pm 1.00 \times 10^{-2})$ ($n=54, s=0.011, F=1546.05, r^2=0.967, q^2=0.965$) 및 $S(S11)=-1.36 \times 10^{-3} (\pm 4.53 \times 10^{-5}) MV + 1.381 (\pm 1.50 \times 10^{-2})$ ($n=54, s=0.016, F=771.785, r^2=0.936, q^2=0.930$)을 나타냄으로서 분자부피와 분자 유사성과의 사이에 규칙적인 관련성이 있다는 사실을 시사한다. 한 예로 S1분자를 기본분자로 한 S와 MV상수와의 관계(Fig. 4)로부터 분자들의 MV 상수가 작아질수록 S=1에 근접하는 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

한편, Fig. 3에는 S=1.0이거나 1.0에 매우 가까운 17개 유사체들의 물리-화학 파라미터 값들을 상호 비교한 것이다. 이들 파라미터들 중에서 cMR 및 IP 등을 위시한 여타의 상수들은 거의 유사한 값을 보이는 반면에 TE, DM, lipole 및 logP값 등은 차이를 보이고 있다. 이같은 결과에 근거하여 유사성 지수 뿐만 아니라, 소수성, 몰라 굴절율 및 분자부피 등의 측면에서 4-androsten- 3,17-dione 과 5 α -androstan-3-one 등, 2개의 화합물이 기존의 음성 페르몬성 물질과 매우 유사한 경향을 보이므로 새로운 돼지 음성 페로몬성 화합물로 예상되었다. 그러나 이들 두 화합물이 기존의 페르몬성 물질을 대체할 수 있는 새로운 돼지 음성 페로몬성 화합물로 판단하기 위하여는 더욱 구체적인 연구가 이루어져야 하겠다.

Table 2. Various physicochemical parameters and similarity indices of androstanone derivatives.

No.	IUPAC Names	SPI	SPII	MWt	clogP	MR	Pol	SA	MV	HyE	DM
1	1,4-Androstadiene-3,17-dione	0.994	0.978	284.40	4.44	84.70	32.33	294.63	273.80	129.43	3.635
2	1,4-Androstadiene-3,11,17-tri one	0.982	0.929	298.38	3.82	85.37	32.42	287.25	272.62	186.34	4.341
3	5 α -Androstan-16 β -bromo-3 α -ol-17-one	0.945	0.974	369.34	4.89	91.33	35.89	333.41	309.98	76.92	3.756
4	5 α -Androstane-3 α ,17 α -diol	0.970	0.989	292.46	3.73	84.63	33.82	302.58	288.24	19.70	2.657
5	5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol	0.970	0.989	292.46	3.73	84.63	33.82	302.58	288.24	19.70	2.657
6	5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol	0.970	0.989	292.46	3.73	84.63	33.82	302.58	288.24	19.70	2.657
7	5 β -Androstane-3 α ,11 β -diol-17-one	0.961	0.985	306.45	3.27	85.40	33.90	316.94	294.61	75.13	3.460
8	5 β -Androstane-3 α ,16 α -diol-17-one	0.966	0.993	306.45	3.68	85.30	33.90	320.01	295.24	72.46	4.476
9	5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol-11-one	0.965	0.997	306.45	3.11	85.30	33.90	307.57	293.14	73.46	5.207
10	5 β -Androstane-3 α ,11 β -diol-17-one 3-glucuronide	0.804	0.841	482.57	2.16	117.68	47.41	444.68	415.27	133.11	3.273
11	5 α -Androstane-17 α -methyl-17 β -ol-3-one	0.962	0.981	304.47	4.01	88.24	35.10	322.90	304.23	78.02	4.132
12	5 α -Androstane-17 α -methyl-17 β -ol-(3,2-c)pyrazole	0.916	0.952	328.50	3.79	96.62	38.17	346.48	324.21	11.18	2.109
13	5 α -Androstan-17 β -ol-3-one	0.975	0.992	290.45	3.93	83.60	33.27	309.16	288.83	77.43	4.053
14	5 β -Androstan-17 β -ol-3-one	0.975	0.992	290.45	3.93	83.60	33.27	309.16	288.83	77.43	4.053
15	5 α -Androstan-3 α -ol-17-one glucosiduronate	0.817	0.833	466.57	3.15	116.09	46.77	445.91	411.97	132.74	5.026
16	5 β -Androstan-3 α -ol-17-one 3-glucuronide	0.815	0.841	466.57	3.15	116.09	46.77	437.89	408.97	134.80	3.036
17	4-Androstene-11 β ,17 β -diol-3-one	0.979	0.948	304.43	2.85	86.02	33.71	303.24	285.00	71.74	5.432
18	4-Androsten-4-ol-3,17-dione acetate	0.976	0.972	344.45	3.25	94.73	36.92	311.09	298.16	188.76	6.831
19	4-Androsten-17 β -ol-3-one-3-(O-carboxymethyl)oxime	0.903	0.932	361.48	4.07	98.82	38.95	367.52	334.76	63.07	4.227
20	4-Androsten-17 β -ol-3-one 17-cypionate	0.836	0.837	412.61	6.00	119.36	47.07	423.75	399.66	143.74	4.465

No.	IUPAC Names	SPI	SPII	MWt	clogP	MR	Pol	SA	MV	HyE	DM
21	4-Androsten-17 β -ol-3-one 17-enanthate	0.842	0.873	400.60	6.18	116.61	46.01	433.65	395.88	141.96	4.390
22	4-Androsten-17 β -ol-3-one 17-glucuronide	0.832	0.837	464.56	2.73	116.71	46.58	425.79	400.01	130.22	3.272
23	5-Androsten-3 β -ol-17-one 3-glucuronide	0.835	0.838	464.56	2.71	116.94	46.58	415.73	395.75	129.80	6.274
24	4-Androsten-17 β -ol-3-one 17-propionate	0.920	0.928	344.49	4.59	98.21	38.67	350.21	328.92	135.88	4.327
25	5-Pregnen-3 β -ol-20-one	0.956	0.935	316.48	4.08	93.76	36.74	313.00	303.82	79.03	5.234
26	1,3,5-oestratrien-3,17 β -diol	0.967	0.984	272.39	4.01	79.62	31.41	292.41	264.84	1.91	2.611
27	steroid nucleus	0.956	0.981	274.49	6.03	85.99	34.38	304.78	292.27	26.57	0.372
28	cholesterol	0.803	0.819	386.66	7.17	120.62	47.67	423.27	402.14	31.78	2.725

S: Similarity indice, MWt; Molecular weight (amu), clogP; calculated hydrophobicity, MR; Molar refractivity (cm³/mol), Pol; Polarizability (Å), SA; Surface area (Å²), MV; van de Waals molecular volume (Å³), HyE; Hydration Energy (kcal/mol), DM; Dipole Moment (Debye).

Table 3. Various physicochemical parameters and similarity indices of androstenone derivatives.

No.	IUPAC Names	SPI	SPII	MWt	clogP	MR	Pol	SA	MV	HyE	DM
SI ^{a)}	5 α -Androst-16-en-3-one (Std.)	1.000	0.991	272.43	4.59	83.20	32.44	289.56	275.14	77.80	2.785
SII ^{a)}	5 α -Androst-16-en-3 α -ol	0.991	1.000	274.45	4.38	84.23	32.99	301.79	282.29	16.62	1.511
SI-1	5 α -Androstane-3,11,17-trione	1.000	0.992	302.41	3.84	83.45	32.80	294.02	282.87	194.20	2.157
SI-2	4-Androsten-11 β -ol-3,17-dione	1.000	0.975	302.41	3.38	85.20	33.16	295.73	279.53	131.37	3.263
SI-3	4-Androsten-17 β -ol-3,11-dione	1.000	1.013	302.41	3.22	85.10	33.16	299.24	283.26	130.10	5.884
SI-4	4-Androsten-19-ol-3,17-dione	1.000	1.024	302.41	3.36	85.38	33.16	297.73	280.53	130.83	1.524
SII-1	5 α -Androstane	0.988	1.018	260.46	5.70	81.45	32.54	288.14	276.24	25.09	0.332

No.	IUPAC Names	SPI	SPII	MWt	clogP	MR	Pol	SA	MV	HyE	DM
SII-2	5 α -Androstane-3,17-dione	0.988	1.051	288.43	4.46	82.78	32.71	301.81	283.13	137.29	2.568
SII-3	5 α -Androstan-3 α -ol-11,17-dione	0.974	1.006	304.43	3.63	84.48	33.35	301.56	288.10	133.08	3.990
SII-4	5 α -Androstan-3 β -ol-16-one	0.974	1.005	290.45	3.79	83.76	33.27	309.92	288.26	76.70	2.344
SII-5	5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	0.981	1.024	290.45	4.25	83.81	33.27	310.15	288.32	76.82	3.564
SII-6	5 α -Androstan-3 β -ol-17-one	0.981	1.024	290.45	4.25	83.81	33.27	310.15	288.32	76.82	3.564
SII-7	4-Androstene-2 α ,17 β -diol-3-one	0.975	1.006	304.43	3.26	85.92	33.71	304.07	285.51	70.42	3.801
SII-8	4-Androstene-2 β ,17 β -diol-3-one	0.975	1.006	304.43	3.26	85.92	33.71	304.07	285.51	70.42	3.801
SII-9	4-Androstene-6 α ,17 β -diol-3-one	0.984	1.024	304.43	2.92	85.94	33.71	303.66	285.64	69.87	3.303
SII-10	4-Androstene-6 β ,17 β -diol-3-one	0.984	1.024	304.43	2.92	85.94	33.71	303.66	285.64	69.87	3.303
SII-11	4-Androstene-15 α ,17 β -diol-3-one	0.978	1.007	304.43	2.79	85.98	33.71	301.99	285.20	71.31	4.419
SII-12	4-Androstene-15 β ,17 β -diol-3-one	0.978	1.007	304.43	2.79	85.98	33.71	301.99	285.20	71.31	4.419
SII-13	4-Androstene-17 β ,19 β -diol-3-one	0.994	1.055	304.43	2.83	86.20	33.71	305.60	285.97	71.14	3.451
SII-14	4-Androstene-3,17-dione	0.996	1.000	286.41	4.36	83.61	32.52	289.21	273.71	132.88	2.665
SII-15	5-Androstene-3 β ,16 α ,17 β -triol	0.969	1.002	306.45	2.52	86.84	34.26	305.26	287.85	13.25	3.375
SII-16	4-Androsten-4 β -ol-3,17-dione	0.989	1.016	302.41	3.46	85.29	33.16	295.39	279.57	126.72	2.952
SII-17	4-Androsten-17 α -ol-3-one	0.989	1.016	288.43	3.84	84.43	33.07	296.57	279.10	73.20	4.303
SII-18	4-Androsten-17 β -ol-3-one	0.989	1.016	288.43	3.84	84.43	33.07	296.57	279.10	73.20	4.303
SII-19	5-Androsten-3 β -ol-17-one	0.988	1.018	288.43	3.82	84.66	33.07	290.21	275.71	76.15	4.848
SII-20	5 β -Androsterone	0.981	1.024	290.45	4.25	83.81	33.27	310.15	288.32	76.82	3.564
SII-21	5 α -androstan-3-one	0.993	1.051	274.45	4.85	82.09	32.63	300.27	282.02	81.10	3.112

S: Similarity indice, MWt :Molecular weight(amu), clogP: calculated hydrophobicity, MR: Molar refractivity (cm³/mol), Pol: Polarizability (Å³),

SA: Surface area (Å²), MV; van de Waals molecular volume (Å³), HyE: Hydration Energy (kcal/mol), DM: Dipole Moment (Debye).

a) Pig pheromonal steroids

4. 결 론

돼지 음성 페르몬성 물질인 5 α -androst-16-en-3-one (S1)와 5 α -androst-16-en-3-ol (S11)의 유사체들을 탐색하기 위하여 lipocaline의 기질 분자로 추정되는 S1의 리간드에 기초하여 55개의 androstanone 유도체들에 대한 분자 유사성 지수(S)와 분자량(MWt), 소수성(logP), 몰라 굴절율(MR), 분극율(Pol), van der Waals 분자 표면적(SA), van der Waals 분자 부피(MV), 수화 에너지(HyE) 및 쌍극자 능율(DM) 등, 다양한 9종의 물리-화학 파라미터들을 계산하고 비교 검토하였다. 그 결과, 특히, S1에 대한 S-값이 1.0인 5 α -androstan-3,11,17-trione (S2), 4-androsten-11 β -ol-3,17-dione (S3), 4-androsten-17 β -ol-3,11-dione (S4) 및 4-androsten-19-ol-3,17-dione (S5) 등, 4개의 이성질체들 중, 소수성 및 입체적인 측면에서 두 화합물, S2 및 S5는 기존의 페르몬성 물질, S1을 대체할 수 있는 새로운 돼지 음성 페르몬성 화합물로 예상되었다.

제 3 절 생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색; II. 휘발성 냄새분자의 리간드와 Porcine Odorant Binding Protein 사이의 결합 친화력에 관한 홀로그래피적 QSAR 모델

1. 서 론

가축들의 수급조절 수단으로 활용하기 위한(Rekwot 등, 2001) 돼지 페로몬성 대체 물질의 탐색에 관한 연구의 일환으로 돼지 옹성 페로몬, 5 α -androst-16-en-3-one의 수용체로 알려진 lipocaline(Gower와 Hancock, 1982)과 비천연 리간드들과의 도킹에 관한 연구(docking studies)들이 진행되고 있다(Herent 등, 1995). 근래, 휘발성 냄새분자의 정량적인 구조와 인식간의 관계(SORs: structure-odor relationships; Rossiter, 1996)를 이해하기 위한 연구들이 부단히 이루어져 OBPs (odorant binding proteins)와 후각 수용체(olfactory receptor) 간 인식에 간한 복잡한 메카니즘이 이해되어(Cutfroth 등, 2003; Shykind 등, 2004; Buck, 2004) 2004년도 노벨 의학상 수상과제가 되기도 하였다. 이와 관련하여 저자들은 냄새분자 인식의 예측성에 관한 정량적인 구조와 활성과의 관계(QSAR; Kubinyi, 1993a)에 대한 모델을 유도하고 검토한 바 있다(Sung 등, 2004a).

최근, 생물학적인 통제에 관한 보고에 따르면, 가축의 재생산과 효율성 측면에서 유의할 만한 개선이 있었다고 하였으나(Shresta 등, 2001) 페로몬성 대체 물질을 개발하지 못하고 있는 실정이다. 이 같은 문제를 극복하기 위한 시도의 일환으로 전보에서(Sung 등, 2004b) 저자들은 천연 리간드, 5 α -뮴겐-16-뉘-3-one를 위시하여 steroid계 유사체들에 관한 물리-화학적인 성질과 분자구조 유사성 지수(Meyer와 Richard, 1991)에 대하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 돼지 페로몬성 대체 물질을 탐색하고 개발하고자 분자설계(molecular design)에 관한 ligand-based approach 방법(Reddy와 Parill, 1999)중에서 가장 강력한 방법 중의 하나인 일련의 냄새 분자로서 2-cyclohexyloxytetrahydrofuran (A) 및 2-phenoxytetrahydrofuran (B) 유도체의 치환기 변화에 따른 정량적인 구조와 돼지 후각 수용체인 pOBP 사이의 결합 친화력(binding affinity) 상수 ($p[Od.]_{50}$)에 관한 분자 홀로그램(H)QSAR(Lewis, 1997) 모델을 유도하고 냄새 분자 중, 특정 원자나 원자단들의 결합 친화력성 여부를 검토하였다.

2. 재료 및 방법

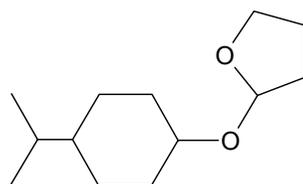
냄새 분자의 친화력 상수; 구조상 비슷한 연관성을 갖는 다양한 유기 화합물

중에서 냄새 분자들은 주로 꽃 향기를 내는 15개의 정제된(99%) 2-cyclohexyloxytetrahydrofuran (A=1~11) 및 2-phenoxytetrahydrofuran (B=12~15) 유도체(Pevsner 등, 1990)들로서 공통된 구조를 Fig. 1에 나타내었다. 그리고 돼지 후각의 근육 조직으로부터 분리 정제한 *p*OBP (22kDa)와 냄새 분자 사이의 관측된(obs.) 결합 친화력 상수($p[Od.]_{50}$) (Dal Monte 등, 1993)를 Table 1에 정리하였다. 이 중에서 12개 화합물을 training set로 설정하여 HQSAR 모델을 유도하는데 이용하였고 3개의 화합물을 test set (6, 8 및 12)로 정하여 모델의 예측성을 검토하였다. Test set 화합물의 선정 기준은 전체 관측값의 크기가 상중하 3계층으로 분류된 것 중에서 각 한 개의 화합물을 그리고 모델의 통계값을 향상시키는 조건 등을 감안하여 편차가 큰 화합물을 선택하였다.

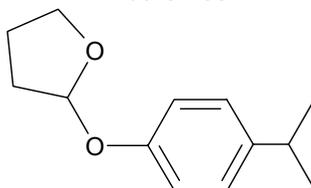
분자 홀로그램의 생성; 분자 모델링과 PLS (partial least square) 분석은 Tripos사(Sybyl)의 분자 모델링 소프트웨어(Ver. 6.91)를 사용하였다. HQSAR (Heritage 등, 1999)은 분자의 3차원 구조를 정렬(alignment)시키지 않고 두 별의 2차원 구조에 대한 지문으로부터 분자조각(fragment) 수를 포함하는 정수의 선형 배열로서 분자들의 구조적인 특성과 결합상수 사이의 내외삽(internal & extrapolation) 예측 관계를 부분 최소자승(PLS)법으로 분석하는 방법이다(Lewis, 1997).

먼저, 각각의 분자에 대하여 조각 수를 2~10 원자 크기의 범위로 생성시키고 분자 CRC (cyclic redundancy check) algorithm을 사용하여 분자의 홀로그램 길이 (53~401)를 선택하고 계산을 실행한다. 이때 final array가 분자 홀로그램이고 채워진 bin들이 변수인 설명 인자들로서 분자의 구조적 정보가 암호화 되어있다. 또한, 홀로그램 길이(array bin의 수)는 설명인자의 차원으로 규정된다. 그리고 구조적인 분자 조각들과 분자 홀로그램 중에 포함된 정보는 몇 가지 파라미터의 설정에 의하여 변경될 수 있다. 따라서 홀로그램 구성 파라미터는 분자 조각의 크기(fragment size)와 조각 특징(fragment distinction)으로 나누어진다.

이 과정에서 hologram lengths는 53~401을 모두 선택하여 PLS 분석을 실행하였으며 조각의 특징은 atoms, bonds, connections, hydrogens 및 chirality 파라미터를 기본적으로 선택한 다음에 분자 조각의 수를 결정하였다. 여기에서는 분자 조각수가 5~8일 때 가장 양호한 통계 값을 얻을 수 있었으므로 그 분자 조각 수(5~8)를 기준으로 hologram lengths는 53~401로 고정하고 각각의 조각 특징을 변화시켜 최종적으로 가장 좋은 통계 값을 갖는 모델을 탐색하였다.



A=1~11



B=12~15

Fig. 1. General structures of used some odorants, 2-(R-cyclohexyloxy) tetrahydrofuran (A) and 2-(R-phenoxy)tetrahydrofuran (B) derivatives.

HQSAR-PLS의 계산; HQSAR 모델은 training set에서 냄새분자의 구조적인 형태와 생물활성 사이의 관계를 PLS 분석(Wold 등, 1983)을 통하여 유도되는 것으로 일반적으로 다음 식의 형태로 표현된다. 여기에서 x_{il} 은 bin, i 이나 또는 위치에서 화합물, i 의 분자 홀로그램에 대한 점유값이고 c_{il} 은 PLS로부터 유도된 bin에 대한 계수이며 L 은 홀로그램의 길이이다.

$$\text{Activity}_i = \sum L x_{il} c_{il} + \text{Const.}$$

자료의 구조에 대한 분자 홀로그램의 계산은 화합물의 수에 분자 홀로그램의 길이를 곱한 차원의 자료를 계산하므로써 얻어진다. PLS 기법은 홀로그램 중에 설명변수 즉, bin들의 채워진 수는 생물활성에 연관된 통계적인 모델을 생성시키는데 사용된다. PLS 분석으로부터 조성의 적정한 수와 가장 좋은 홀로그램 길이 들은 가장 높은 q^2 (best cross-validated r_{cv}^2) 값에 기초하여 선택된다. 주성분의 적정수는 예측의 가장 작은 표준 오차에 연관되어 있으며 그것은 leave-one out (LOO) cross-validation (cv.) 과정에 의하여 결정된다. 그러므로 그 과정은 적정한 예측 모델을 위하여 성분(component) 수를 결정하며 data set에서 각 성분의 결합상수 값과 연관된 분자 홀로그램 bin의 관계를 수식으로 나타낸다. 화합물의 예측된 활성들은 cross-validated standard error(SE_{cv})와 예측도, q^2 값의 계산이 허용된다. 따라서 적정한 주성분의 수를 사용하여 non cross-validation (ncv.) 과정으로 유도되는 예측 모델에 대하여 최종 PLS 분석을 실행한다. 기본적으로 H 원자와 chirality가 제외된 채로 atom, bond 및 connections들이 홀로그램을 생성하는데 사용된다. 모델의 질은 예측성(q^2 : predictive ability > 0.50) 그리고 적합성

($0.90 > r_{\text{ncv}}^2$: goodness of fit)의 척도로 가늠하며 예측력은 LOO cross-validation 으로 결정된다. 최종적인 PLS 계산 결과는 기여도(contribution map) 형태로 얻어지며 training set 중의 예측값 중에서 가장 높은 결합 친화력 상수(Pred.)를 나타낸 2-(*trans*-3-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran (**5**)와 가장 낮은 경우인 2-(*trans*-4-*tert*-butylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran (**11**) 분자 조각들의 기여도(atomic contribution)를 비교 할 수 있도록 함께 제시하였다.

Table 1. The observed binding affinity constants (Obs.p[Od.]₅₀) with porcine odorant binding protein (pOBP), predicted values (Pred.p[Od.]₅₀) by HQSAR methodology and their deviation (Dev.)

No.	IUPAC Names	Obs.	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
1	2-(1-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	5.96	5.96	0.00
2	2-(<i>cis</i> -2-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	5.78	5.77	0.01
3	2-(<i>trans</i> -2-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	5.89	5.84	0.05
4	2-(<i>cis</i> -3-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	6.05	6.13	-0.08
5	2-(<i>trans</i> -3-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	6.29	6.22	0.07
6 ^{c)}	2-(<i>cis</i> -4-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	6.11	5.79	0.32
7	2-(<i>trans</i> -4-methylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	5.72	5.79	-0.07
8 ^{c)}	2-(<i>cis</i> -4-isopropylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	4.34	4.96	-0.62
9	2-(<i>trans</i> -4-isopropylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	4.99	4.96	0.03
10	2-(<i>cis</i> -4- <i>tert</i> -butylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	4.61	4.51	0.10
11	2-(<i>trans</i> -4- <i>tert</i> -butylcyclohexaneoxy)tetrahydrofuran	4.38	4.51	-0.13
12 ^{c)}	2-(4-methylphenol)tetrahydrofuran	5.65	5.31	0.34
13	2-(ethylphenol)tetrahydrofuran	5.29	5.26	0.03
14	2-(isopropylphenol)tetrahydrofuran	4.97	5.04	-0.07
15	2-(<i>tert</i> -butylphenol)tetrahydrofuran	4.96	4.92	0.04
	ARTS (Average residual of training set)	-	-	0.057
	ARTS (Average residual of test set)	-	-	0.427

^{a)}The predicted values were calculated according to the model XI in Table 3.,

^{b)}different between observed values and predicted values., ^{c)}test set compound.

3. 결과 및 고찰

결합 친화력 상수; 음성 돼지 페로몬성 대체 물질을 탐색하려는 시도로 전보에서(Sung 등, 2004b) 저자들은 5 α -androst-16-en-3-one과 50 여종의 steroid계 유사체들에 관한 분자구조 유사성지수 (Meyer 등, 1991)를 계산하여 비교한 바,

4-androsten-3,17-dione과 5 α -androsten-3 β -ol- 17-one이 5 α -androst- 16-en-3-one과 입체적인 측면 뿐만 아니라, 물리-화학적 성질들이 매우 비슷한 경향을 나타내었다. 또한, 5 α -androst-16-en-3-one의 수용체로 알려진 lipo- caline(Gower 등 1982)과 결합하는 비천연 리간드들과의 도킹에 관한 연구(docking studies)들은 지금까지 알려진 냄새 물질 중에서(Herent 등, 1995) 분자의 크기나 모양 그리고 극성 등, 여러 가지 요인을 감안하여 pOBP의 결합위치에 대한 적응성을 조사할 목적으로 이루어 졌으며 benzophenone, dihydromyrcenol, 및 undecanal 등, 몇 가지 화합물(Vincent 등, 2000) 검토되었다. 여기에서 다루어진 15개의 2-cyclohexyloxytetrahydrofuran (A) 및 2-phenoxytetrahydrofuran (B) 유도체(Fig. 1)들(Pevsner 등, 1990)과 pOBP간의 예측된(Pred.) 결합 친화력 상수 (p[Od.]₅₀)들(Table 1)은 대체로 지방족 cyclohexyl-치환체(A)가 방향족 phenyl-치환체(B) 보다 높은 결합 친화력을 나타내었다(A>B). 또한, 2-methyl 치환체(2, 3)는 cis \leq trans, 3-methyl 치환체(4, 5)는 cis<trans 그리고 4-methyl, 4-isopropyl 및 tert-butyl 치환체 (6~11)는 cis=trans의 경향이였다. 이 중에서 5 (p[Od.]₅₀=6.29)가 제일 높은 결합 친화력 상수를 나타낸 반면에 11 (p[Od.]₅₀=4.38)이 가장 낮은 결합 친화력 상수를 나타내었다. 따라서 12개 화합물을 training set로 설정하여 HQSAR 모델을 유도하였고 3개 화합물의 test set로부터 모델의 예측성을 검토하였다.

분자 조각과 특징의 영향; 냄새 분자(A 및 B) 유도체(Fig.1)들을 대상으로 한 홀로그래피적인 정량적 구조-활성관계(HQSAR)에 관한 분석(Lewis, 1997)으로부터 가장 좋은 HQSAR 모델을 얻기 위하여 먼저, training set 화합물에 대한 분자 조각 크기의 영향을 조사하여 Table 2에 정리하였다. 그 결과, 분자 조각 크기 2~10 그리고 best length 53~353bin의 조건에서 유도된 모델(I ~ VI) 중, “모델 IV”가 분자 조각 크기 5~8 그리고 best length 307 bin, 주성분 수는 4이고 예측성은 $q^2=0.900$ 그리고 상관성이 $r^2_{ncv}=0.982$ 로 매우 양호하였다. 그리고 분자 조각의 크기에 대한 변화가 모델(분자 조각 크기: 5~8)을 통계적으로 개선하지 않고 있음을 나타내고 있다. 따라서 한 분자의 분자적 성질과 구조는 생물활성을 포함하는 하나의 2D 지문안에 암호화 할 수가 있기 때문에 그 지문으로부터 분자의 활성을 예측할 수 있다.

한편, Table 2의 결과에 따라 분자 조각의 수(5~8)를 고정하고 분자 조각의 특징에 관한 영향을 조사하기 위하여 각각의 조각 특징을 변화시켜 최종적으로 가장 좋은 통계 값을 갖는 best model을 탐색하였다. 분자 홀로그램에 다른 분자 조각 특징에 대한 정보를 첨가하였으나 통계치가 크게 개선되지 않았다. 따라서 Table 3는 atoms, connectivity, chirality 그리고 atom 등을 구별하는 분자 조각

특징에 관한 정보들을 사용하여 유도된 모델들(VII~XI)을 유도하여 정리하였다. 그 결과, 분자 조각의 특징중에서 입체성에 관한 키랄성(chirality)이 가장 중요한 요소이었으며 best length가 97일 경우에 주성분 수는 5이고 예측성은 $q^2=0.916$ 그리고 상관성이 $r_{ncv}^2=0.988$ 으로 가장 양호한 “모델 XI”을 유도하였다. 그러므로 냄새 분자(키랄탄소 원자의 수: A=2~4 및 B=1~2)와 돼지 후각 수용체인 OBPs 사이의 효소-기질간 반응이 키랄성에 의존성을 나타낸다는 사실은 이들 반응이 비 대칭적으로 이루어 지고 있음을 시사한다.

Table 2. HQSAR analyses for the influence of various *fragment sizes* on the key statistical parameters

Models	Fragment size	Best length	$r_{cv}^2(q^2)$	SE_{cv}	r_{ncv}^2	SE_{ncv}	NC
I	2~5	53	0.891	0.277	0.972	0.142	5
II	3~6	59	0.892	0.276	0.983	0.110	5
III	4~7	401	0.896	0.222	0.936	0.173	2
IV	5~8 ^{a)}	307	0.900	0.246	0.982	0.106	4
V	6~9	353	0.892	0.255	0.981	0.108	4
VI	7~10	353	0.902	0.228	0.973	0.119	3

^{a)}The best of fragment size., SE_{cv} :cross-validated standard error., SE_{ncv} :non cross-validated standard error, NC :number of component.

모델XI의 예측성; HQSAR 모델을 위시하여 3D-QSAR 모델(Kubiyi, 1993b)의 질은 예측성(q^2 (또는 r_{cv}^2) :predictive ability>0.50) 그리고 적합성($0.90 > r_{ncv}^2$:goodness of fit)의 척도로 가늠하며 예측력은 LOO cross-validation으로 결정되는데 모델XI은 이들 기준을 크게 상회하는 매우 좋은 모델이다. Table 1에는 HQSAR 모델XI로 계산된 냄새 분자들의 예측된 결합 친화력 상수(Pred.p[Od]₅₀)와 관측된 상수값과의 차이값(Dev.)을 각각 정리하였다. 전반적으로 training set의 평균 차이값(ARTS=0.057)이 극히 작으므로 관측값과 예측값의 두 값이 매우 잘 일치함을 설명하고 있다. 이는 모델XI의 표준편차($SE_{cv}=0.244$ 및 $SE_{ncv}=0.094$)가 매우 작기 때문이며 유도된 모델은 예측성이 매우 좋은 모델로 평가된다. Fig. 2 에는 전체 화합물(Table 3)에 대하여 HQSAR 모델XI에 의한 예측값과 관측된 결합 친화력 상수와의 비례관계를 나타내었다.

Table 3. HQSAR analyses for various fragment distinction on the key statistical parameters using *fragment size* default (5~8)

Models	Fragment distinctions	Best length	$r^2_{cv.}(q^2)$	$SE_{cv.}$	$r^2_{ncv.}$	$SE_{ncv.}$	NC
VII	Atoms/bonds ^{b)}	53	0.905	0.211	0.948	0.156	2
VIII	Connections	307	0.900	0.246	0.982	0.106	4
IX	Hydrogen	53	0.889	0.280	0.985	0.102	5
X	Connectivity-Hydrogen	401	0.875	0.297	0.985	0.104	5
XI ^{a)}	Chirality	97	0.916	0.244	0.988	0.094	5

^{a)}The best HQSAR model, ^{b)}In all case, the *atoms* and *bonds* fragment distinction are turned on., $SE_{cv.}$: cross-validated standard error., $SE_{ncv.}$: non cross-validated standard error., NC: number of component.

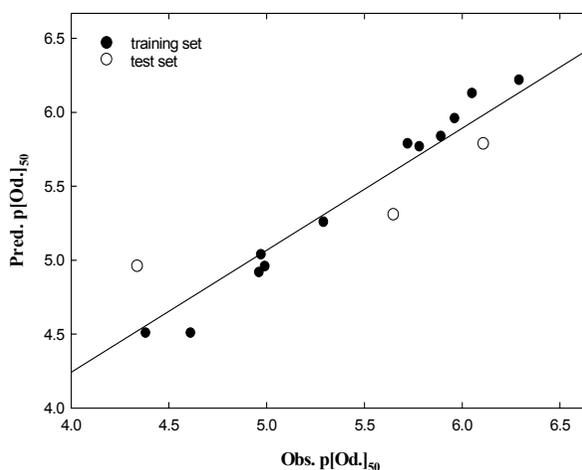


Fig. 2. Relationships between observed (obs.) binding affinity constants ($p[Od.]_{50}$) for porcine odorant binding protein (*pOBP*) and odorant molecules, and predicted values (pred.) by HQSAR model XI. (Training set: $Pred.p[Od.]_{50}=0.984(Obs. p[Od.]_{50})+0.087$ ($n=12$, $s=0.073$, $F=775.811$, $r^2=0.992$ & $q^2=0.975$).

Fig. 2에서 전체 화합물($n=15$)을 대상으로 한 관계식($Pred. p[Od.]_{50}=0.825(Obs. p[Od.]_{50})+0.942$ ($n=15$, $s=0.191$, $F=110.428$, $r^2=0.902$ 및 $q^2=0.865$) 보다 training set($n=12$)에 대한 관계식($Pred.p[Od.]_{50}=0.984(Obs. p[Od.]_{50})+0.087$ ($n=12$, $s=0.073$,

F=775.811, $r^2=0.992$ 및 $q^2=0.975$)이 예측성과 상관성 측면에서 매우 양호함을 보이고 있다. 그러나 test set의 경우, 직선 관계에서 벗어난 경향을 보이므로서 평균 차이값(ARTS=0.427)이 큰 값을 나타내는 이유는 test set 화합물 선발시 차이가 큰 화합물을 training set에서 배제하였기 때문이다.

높은 결합성 분자의 조건; 최종 PLS 분석 결과들을 가시적으로 분석할 수 있도록 하기 위하여 Fig. 3에는 예측값이 가장 큰 활성 분자(5)와 상대적으로 비활성을 나타낸 분자(11) 조각들의 기여(atomic contribution) 정도를 나타내었다. 기여도로부터 가장 큰 활성 분자(5) 중, 2-oxyfuryl group 부분의 C3 및 C5 원자는 *p*OBP와의 결합 친화력에 강하게 기여(green)하고 나머지 부분은 중간정도(gray)의 기여를 나타내고 있음을 볼 수 있다. 반면에 가장 낮은 활성을 나타낸 분자(11)의 경우에는 tert-butyl group의 중심 탄소원자와 furyl group중 C4 원자의 methylene group이 기여하지 않는(red) 경향을 나타내었다. 이와 같이 정확한 HQSAR “모델XI”은 분자 홀로그램의 길이 뿐만 아니라, 분자 조각과 특징에 포함된 정보들에 의존적이기 때문에 선택하는 홀로그램 길이에 기초하여 가장 낮은 cross-validated standard error (SE_{cv})를 최소화하거나 가장 높은 예측도(q^2)를 찾음으로서 높은 결합 친화력을 나타내는 분자의 구조와 특징을 알아낼 수 있다.

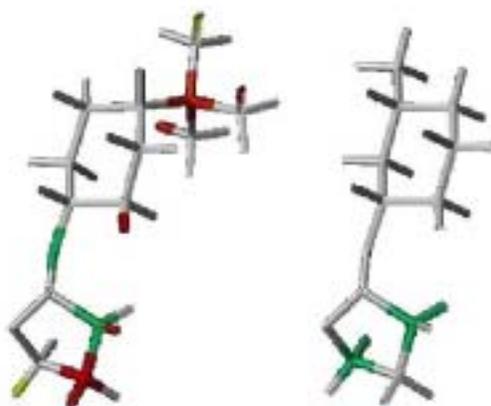


Fig. 3. Atomic contributions to the binding affinity constants ($p[Od.]_{50}$) of odorant molecules (Left: 11, $Pred.p[Od.]_{50}=4.51$ & Right: 5, $Pred.p[Od.]_{50}=6.22$): Green color denotes the greatest contribution to the binding affinity while red signifies least contribution and gray color signifies average contribution.

이상과 같이 냄새 분자들의 정량적인 구조와 수용체인 *p*OBP-리간드 간 결합 친화력 상수($p[\text{Od.}]_{50}$)와의 관계에 대한 정보들은 대체 페로몬성 화합물뿐만 아니라, 인위적인 펩타이드(artificial peptides)와 냄새(또는 맛)를 식별하는 biosensor (Felicioli 등, 1994)들의 설계를 위한 기초적인 요소로도 활용된다. 다음 연구는 냄새 물질의 리간드와 *p*OBP 사이의 결합 친화력 상수에 관한 3D-QSAR 모델로서 비교 분자장 분석(CoMFA) 모델과 비교 분자유사성 지수분석(CoMSIA) 모델을 유도하고 *p*OBP와 냄새분자 간 물리-화학적인 상호작용과 높은 결합 친화력을 나타낼 수 있는 분자의 구조적인 요건에 관하여 이해하고자 한다.

4. 결 론

돼지 옹성 페르몬인 5 α -androst-16-en-3-one을 대체할 수 있는 활성 분자를 탐색하여 가축의 생산과 수요를 조절하기 위한 생물학적 자극 통제 수단으로 활용하고자 냄새 분자로서 2-cyclohexyloxytetrahydrofuran (A) 및 2-phenoxytetrahydrofuran (B) 유도체들의 구조 변화와 수용체인 porcine odorant binding protein (*p*OBP)에 대한 결합 친화력 상수($p[\text{Od.}]_{50}$) 사이의 정량적인 구조-활성관계에 관한 분자 HQSAR 모델X를 유도하였다. 냄새 분자중에서 cyclohexyl-치환체(A)가 phenyl-치환체(B) 보다 높은 결합 친화력을 나타내었으며(A>B) 모델X는 분자 조각크기(5~8), 홀로그램 길이(97 bin)의 키랄성(chirality) 조건에서 예측성($q^2=0.916$)과 상관성($r^2=0.988$)이 매우 양호하였다. 기여도로부터 냄새 분자의 결합 친화력 상수에 기여하는 부분은 2-oxyfuryl group의 C3 및 C5 원자이었다.

제 4 절 생물학적 자극통제수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색; III. 2-(Cyclohexyloxy) tetrahydrofuran 유도체와 Porcine Odorant Binding Protein 사이의 결합 친화력에 관한 비교 분자장 분석

1. 서 론

돼지 음성 페로몬, 5 α -androst-16-en-3-one (또는 5 α -androst-16-en-3-ol)의 수용체로 알려진 lipocalin (Gower와 Hancock, 1982)과 결합하는 비천연 리간드들과의 도킹에 관한 연구들(Spinelli 등, 2002) 뿐만 아니라, 냄새 물질과 결합하는 (Pevsner 등, 1990) odorant binding protein (OBP) 간의 구조-활성관계에 관한 연구(Pelosi와 Tirindelli, 1989)들이 활발하게 이루어지고 있다(Krzymowski 등, 1999). 지금까지 bovine OBP에 의하여 인식되어 이미 알려진 냄새 물질 중에서 (Herent 등, 1995) 분자의 크기나 모양 그리고 극성 등, 요인들을 감안하여 porcine odorant binding protein (pOBP)의 결합위치에 대한 적응성을 조사할 목적으로 검토된 화합물로는 benzophenone, benzylbenzoate, dihydromyrcenol, selenazol, thymol, 2-methoxy-3-(2-methyl-propyl) pyrazine 및 undecanal 등 (Vincent 등, 2000)이 있다. 이러한 연구들은 가축들을 생물학적으로 통제하고 그 수단으로 활용하기 위하여(Rekwot 등, 2001) 돼지 페로몬성을 발현하는 대체 물질의 탐색에 관한 연구의 목적으로 이루어지고 있다. 근래, 보고에 따르면 상품화(PBS)된 sex odor aerosol (SOA)를 사용한 결과, 가축의 재생산과 효율성 측면에서 유의할 만한 개선이 있었다고 하였으나(Shrestha 등, 2001) 상용화된 것은 페로몬성 대체 물질이 아니라, 합성된 천연 리간드인 5 α -androst-16-en-3-one을 사용하고 있다. 이 같은 실상을 개선하고자 저자(Sung 등, 2004)는 천연 리간드와 유사한 steroid계 화합물들에 관한 물리-화학적인 성질과 분자구조의 유사성 지수(similarity index) 그리고 기질분자의 구조적 특성에 관한 분자홀로그래픽(H) QSAR 모델에 관하여 보고(Sung 등, 2005)하였다.

본 연구에서는 아직까지 분명하게 밝혀지지 않은 OBP와 후각 수용체(olfactory receptor) 간의 복잡한 메카니즘을 이해하는데 있어서 가장 중요한 단서들을 수집하여 생물학적인 통제 수단으로 활용하기 위한 시도의 일환으로 휘발성 냄새 분자의 리간드를 탐색하고자 하였다. 그리고 직선 자유 에너지관계(Sung, 2002)에 기초한 일련의 휘발성 냄새 분자로서 2-(cyclohexyloxy)tetra-

hydrofuran 유도체들과 수용체인 pOBP 사이의 결합 친화력 상수($p(\text{Od})_{50}$)에 미치는 구조와 활성과의 관계를 이해하기 위하여 3D-QSAR 방법(Kubinyi, 1993)으로 비교 분자장 분석(CoMFA) (Cramer 등, 1988)을 실행하고 검토하였다.

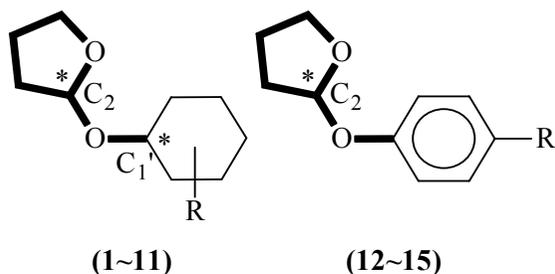


Fig. 1. Compound used as template for molecular alignment showing: in bold face is shown the reference atoms used in multifit alignment protocol of the SYBYL program. The $C_{1'}$ and C_2 atoms in substrate molecules are chiral center.

2. 재료 및 방법.

분자의 모델링; 다양한 유기화합물 유도체들 중에서 선택된(Pevsner 등, 1990) 냄새 물질인 기질분자로서 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofuran 유도체들의 구조(Fig. 1)와 pOBP 간 결합 친화력 상수($p(\text{Od})_{50}$) (Dal Monte 등, 1993)들을 Table 1에 정리하였다. CoMFA 분석은 Tripos사(Ver. 7.1)의 분자 모델링 소프트웨어(SYBYL)와 HINT 프로그램(Ver. 3.07S)을 사용하였다. 먼저, 가장 안정한 분자의 3차원 형태를 얻기 위하여 2D 구조를 simulated annealing 방법(Kerr, 1994)으로 3차원 구조(3D)의 분자로 전환하여 가장 안정한 형태(conformer)를 탐색하였다. 지방족 cyclohexyl 고리 치환체의 경우(1~11)에는 cis-trans 구분이 되지 않음으로 입체중심인 tetrahydrofuryl 고리의 2번 탄소원자(C_2)와 cyclohexyl 고리의 1번 탄소원자($C_{1'}$)에 대한 키랄성(R 및 S 형)을 $C_1(R)C_2(R)$, $C_1(R)C_2(S)$, $C_1(S)C_2(R)$, $C_1(S)C_2(S)$ 등, 4가지 조합으로 분류하였다.

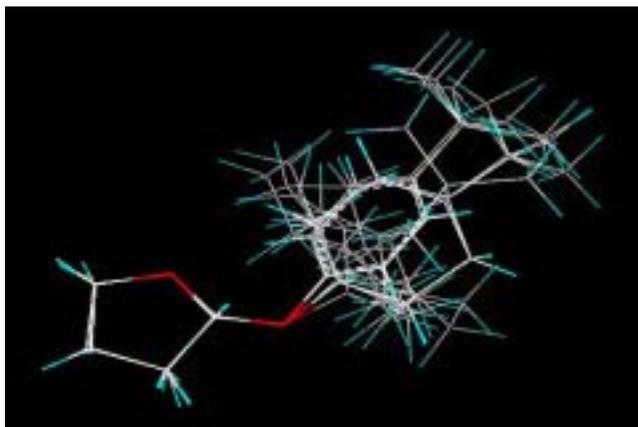


Fig. 2. Alignment of the potential energy minimized odorants, substrate structures with chirality ($C_1'(R)$, $C_2(S)$) according to a least-square atom based fit (A).

이때 cyclohexyl 고리상에 치환기가 결합된 제3의 입체중심 탄소원자에 대하여는 키랄성을 부여하지 않았다. 왜냐하면, 키랄성 여부에 관계없이 모두 비슷한 통계결과를 나타내었기 때문이다. 그리고 방향족 phenyl 고리 치환체의 경우(12~15)에는 입체중심이 tetrahydrofuran 고리의 2번 탄소원자(C_2) 한 부분이므로 입체배열에 따라 앞서 4가지 조합중에 포함시켰다. CoMFA field를 구하기 위한 전 단계로서 template로는 2-tetrahydrofuranyloxy group을 그리고 치환기 부분으로는 cyclohexyl과 phenyl group (Fig. 1)을 활용하여 atom based fit (A) 방법 (Marshall 등, 1979)과 field fit (F) 방법(Clark 등, 1990)으로 3차원 공간상에 정렬하여 중첩시키고 standard field (S) 및 indicator field (I)를 조합한 각각의 CoMFA field와 정렬방식(A 및 F)에 따른 CoMFA 모델을 유도하였다.

CoMFA 설명인자의 계산; 냄새분자의 정렬 방식과 키랄성에 따른 CoMFA 모델을 유도하기 위하여 1.0~3.0Å의 space grid 범위 내에서 탄소 probe atom (sp^3 및 +1 전하)을 규칙적으로 배열하였다. Tripos force field의 probe 원자와 나머지 분자간 분산력(dispersion)에 따른 정전기적 상호작용을 이해하기 위하여 Lennard-Jones potential에 의한 입체장(Van der Waals potential)과 정전기장(Coulomb potential)의 조합으로 CoMFA 장을 계산하였다. 이때 원자의 전하들은 Gasteiger-Hückel 방법으로 계산하였으며 결합 친화력 상수($p(Od)_{50}$)에 대한 입체장 및 정전기장에 소수성적 상호작용(HINT)으로 조합되어있는(Kellogg 등, 1991) CoMFA field로 구성된 모델을 유도하였다.

부분 최소자승 분석; 3차원 공간상에 정렬된 3D 구조의 특징과 결합 친화력 상수와의 상관성은 부분 최소자승(partial least square: PLS)방법(Stahle과 Wold, 1988)으로 분석하여 CoMFA 모델들의 통계값들을 구하였다. 이 과정에서 최적의 주성분 수를 결정하기 위하여 leave-one-out (LOO) cross validation (cv)과정을 실행하여 예측성, r^2_{cv} (또는 q^2)값을 구한다.

그리고 마지막 CoMFA 모델은 최적의 성분수와 non-cross-validation (ncv)으로 유도되어 상관계수, r^2_{ncv} 등을 얻는다. 기질분자와 pOBP사이의 결합 친화력 상수에 미치는 CoMFA장에 관한 등고도(contour map)는 유도된 모델들에 포함된 정보들을 시각적으로 관찰하기 위하여 CoMFA 계수들과 그것들의 회합된 표준편차 사이의 생성물을 해석함으로써 얻어진다.

Table 1. Observed (Obs.) binding affinities ($p(\text{Od})_{50}$) of 2-(cyclohexyloxy) tetrahydro- furanes and predicted (Pred.) values by the best CoMFA models with atom based fit (A) and field fit (F) alignments

No.	IUPAC name of odorants	Obs.	A		F	
			Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
1	2-(1-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	5.96	5.89	0.07	5.88	0.08
2	2-(<i>cis</i> -2-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	5.78	5.83	-0.05	5.85	-0.07
3	2-(<i>trans</i> -2-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	5.89	5.98	-0.09	5.99	-0.10
4	2-(<i>cis</i> -3-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	6.05	6.07	-0.02	6.08	-0.03
5	2-(<i>trans</i> -3-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	6.29	6.20	0.09	6.18	0.11
6 ^{c)}	2-(<i>cis</i> -4-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	6.11	5.68	0.43	5.70	0.41
7	2-(<i>trans</i> -4-methylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	5.72	5.68	0.04	5.70	0.02
8 ^{c)}	2-(<i>cis</i> -4-isopropylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	4.34	4.91	-0.57	4.93	-0.59
9	2-(<i>trans</i> -4-isopropylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	4.99	4.92	0.07	4.92	0.07
10	2-(<i>cis</i> -4- <i>tert</i> -butylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	4.61	4.48	0.13	4.49	0.12
11	2-(<i>trans</i> -4- <i>tert</i> -butylcyclohexyloxy)tetrahydrofuran	4.38	4.48	-0.10	4.49	-0.11
12 ^{c)}	2-(4-methylphenoxy)tetrahydrofuran	5.65	5.77	-0.12	5.75	-0.10
13	2-(4-ethylphenoxy)tetrahydrofuran	5.29	5.35	-0.06	5.33	-0.04
14	2-(4-isopropylphenoxy)tetrahydrofuran	4.97	4.99	-0.02	4.97	0.00
15	2-(4- <i>tert</i> -butylphenoxy)tetrahydrofuran	4.96	5.03	-0.07	5.03	-0.07
	Ave. ^{d)}			0.068		0.068
	Test. Ave. ^{e)}			0.373		0.367

^{a)}Predicted values by the best models, AIV and FIV in Table 2., ^{b)}difference of observed (obs. $p(\text{Od})_{50}$) values and ^{c)}predicted (pred. $p(\text{Od})_{50}$) values, ^{c)}test set compound, ^{d)}average residual of training set, ^{e)}average residual of test set.

3. 결과 및 고찰

냄새 분자들의 입체구조: 기질분자, 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofuran 유도체와 수용체(pOBP)간의 반응에 있어서 소수성(hydrophobicity)은 냄새물질의 생체 내 흡수와 이동에 있어서 가장 중요한 요인 중의 하나이다. 소수성과 전자효과 사이에는 상관성이 없는 반면에 이온화와 분자의 크기에 연관성이 있으며 (Kansy, 1996) 선택된 냄새 분자들은 $\log P=3.15\sim 4.95$ 범위의 소수성을 가지는 화합물이다. 따라서 냄새 분자와 pOBP 간 결합 친화력과의 관계(Pevsner 등, 1990)에 관한 모델(Abraham 등, 2002)에서도 소수성이 포함되어 다양하게 연구된 바 있다. 여기에서 다른 냄새 분자들은 주로 꽃향기를 내는 cyclohexanol과 phenol 유도체들인 15개의 정제된(99%) tetrahydro- furanyl ether 분자들이다 (Dal Monte 등, 1993). 공통된 분자의 template와 상이한 치환기들의 구조를 Fig. 1에 나타내었으며 냄새 분자들과 그들의 결합 친화력 상수($p(\text{Od})_{50}$)들을 Table 1에 정리하였다. 이들 냄새 분자들의 결합 친화력 상수($p(\text{Od})_{50}$)는 4.34~6.29의 분포를 나타내며 기하 이성질체로서 cis-체보다 trans-체가 대체로 높은 값(trans>cis)을 보이고 있다. 이때 cis- 및 trans-체의 구분은 cyclohexanol 고리상 C-O 결합의 공간 배향에 대하여 cyclohexyloxy 고리상 치환기가 같은 방향이면 cis-체이고 반대 방향인 경우에는 trans-체 배열로 간주된다. 그러나 2D 구조를 3D 구조로 전환하는 안정적인 형태를 탐색하는 과정에서 cis-체의 결정이 여의치 않았다. 또한, 지방족 cyclohexyl 치환체들이 방향족 phenyl 치환체보다 대체로 높은 결합 친화력을 나타내었다.

Table 2. Statistical results of CoMFA models^{a)} with two alignment types and chirality of stereo centers ($C_1'(R)$ & $C_2(S)$) in substrate molecule

Models	Fields			PLS analyses		
	S	I	H	$r_{cv.}^2$ ^{b)}	$r_{ncv.}^2$ ^{c)}	SEE ^{d)}
AI	✓			0.887	0.981	0.095
AII	✓		✓	0.883	0.977	0.104
AIII		✓	✓	0.865	0.975	0.108
AIV ^{e)}	✓	✓		0.886	0.984	0.086
AV	✓	✓	✓	0.873	0.976	0.106
FI	✓			0.882	0.979	0.099
FII	✓		✓	0.898	0.970	0.119
FIII		✓	✓	0.880	0.966	0.126
FIV ^{e)}	✓	✓		0.881	0.983	0.090
FV	✓	✓	✓	0.893	0.970	0.119

Abbreviation: S=standard, I=indicator, H=H-bond, A: atom based fit alignment, F: field fit alignment, ^{a)}Number of component=2, ^{b)}cross-validated r^2 , ^{c)}non-cross-validated r^2 , ^{d)}standard error estimate. ^{e)}the optimized model (grid: 1 Å).

Table 3. Statistical results of CoMFA models with two alignment types and chiralities of stereo centers (C_1' & C_2) in substrate molecule

Chiralities	$C_1'(R), C_2(R)$		$C_1'(S), C_2(R)$		$C_1'(S), C_2(S)$		$C_1'(R), C_2(S)$		
	No.	AI	FI	AII	FII	AIII	FIII	AIV ^{a)}	FIV
Fields		SI	SIH	SIH	SIH	SI	SI	SI	SI
Grid(Å)		1.0	3.0	3.0	3.0	1.5	1.0	1.0	1.0
Components		2	2	2	2	2	2	2	2
$r_{cv}^2(q^2)^b)$		0.864	0.878	0.881	0.903	0.855	0.862	0.886	0.881
$r_{ncv}^2)^c)$		0.981	0.984	0.977	0.974	0.973	0.967	0.984	0.983
SEE _{ncv} . ^{d)}		0.096	0.088	0.104	0.111	0.113	0.124	0.086	0.090
F value ^{e)}		226.80	269.98	193.02	168.85	162.05	133.21	281.44	258.92
Steric		0.432	0.468	0.407	0.455	0.450	0.435	0.408	0.395
Electrostatic		0.103	0.062	0.130	0.088	0.123	0.121	0.146	0.155
ClogP		0.465	0.470	0.463	0.457	0.427	0.444	0.446	0.450

^{a)}The best model, ^{b)}cross-validated r^2 , ^{c)}non-cross-validated r^2 , ^{d)}standard error estimate, ^{e)}fraction of explained versus unexplained variance.

CoMFA 모델: 기질 분자(Fig. 1)의 입체배열에 대한 키랄성(R 및 S 형)을 $C_1(R)C_2(R)$, $C_1(R)C_2(S)$, $C_1(S)C_2(R)$, $C_1(S)C_2(S)$ 등, 4가지 조합으로 분류하고 한 가지 입체배열 당, A 및 F 등, 2가지 방법으로 정렬하였다. 한 예로, Fig. 2에는 A방법에 따른 정렬을 나타내었는데 분자간 중첩에서 벗어난 치환기들의 변화에 따라 결합 친화력이 서로 다르게 나타난다. 그리고 한 가지 정렬 방법에 대하여 standard field (S), indicator field (I) 및 H-bond field(H) 등, 3가지 CoMFA field의 5가지 조합에 따르는 10개의 CoMFA 모델을 유도하였다. 따라서 1가지 입체배열 당, 10개의 모델, 총 40개의 모델을 유도하여 비교 분자장 분석을 실시하였다.

입체배열이 $C_1'(R), C_2(S)$ 인 경우, CoMFA 장의 조합과 grid의 변화에 따른 10개의 모델들에 대한 통계값들을 Table 2에 정리하였다. 이들 모델 중에서 SI장의 조합과 grid 1.0Å 조건의 모델(AIV 및 FIV)이 가장 양호한 모델이었다. 이와 같은 방법으로 4가지 입체배열 중, 한 가지 입체배열에 대한 A 및 F 등, 2가지 정렬방법에 따른 모델들을 유도하여 가장 양호한 모델들(AI~AV 및 FI~FV)을 Table 3에 요약하였다. 검토결과, 가장 양호한 모델은 $C_1'(R), C_2(S)$ 의 조건과 A정렬에서 유도된 모델 AIV이었다. 또한, $C_1'(R), C_2(S)$ 의 조건에서 방향족 화합물만을 test set으로 설정한 경우의 모델($n=11$, field=S, grid(Å)=2.0, 조성수=2, $r_{ncv}^2=0.806$ 및 $r_{cv}^2=0.951$)과 test set 없이 전체 화합물을 대상으로 유도된 모델($n=15$, field= SI, grid(Å)=1.0, 조성수=4, $r_{ncv}^2=0.743$ 및 $r_{cv}^2=0.980$)도 유도하여 통계값들을 검토하였으나 모델 AIV보다 양호한 모델은 존재하지 않았다.

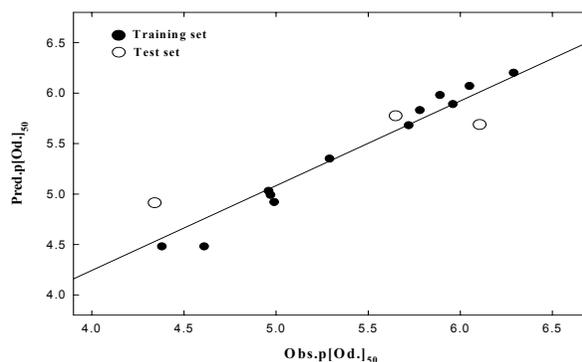


Fig. 3. Relationships between observed binding affinity constants (Obs.) and predicted binding affinity constants (Pred.) by CoMFA model AIV. For data set; $Pred. (p(Od)_{50}) = 0.839Obs. (p(Od)_{50}) + 0.885$ ($n=15$, $s=0.182$, $F=125.481$, $q^2=0.855$ & $r=0.952$)

선택된 모델, AIV는 상관성을 의미하는 non-cross-validation $r_{ncv}^2=0.984$ 와 표준 오차 $s=0.086$ 그리고 예측성을 나타내는 LOO cross-validation r_{cv}^2 값 (또는 q^2)이 $r_{cv}^2=0.886$ 이었으며 결합 친화력 상수에는 입체장 40.8%, 정전기장 14.6% 그리고 소수성장(ClogP)이 44.6%로 영향을 미치는 요소이었다. 이 모델로 Table 1의 냄새 분자들에 대한 결합 친화력 상수의 예측값($pre.p(Od)_{50}$)을 계산하고 관측값($obs.p(Od)_{50}$)과 예측값과의 차이(Dev.)를 정리하였다. 그리고 관측된 결합 친화력 상수와 CoMFA 모델AIV에 의하여 계산된 예측값과의 관계를 Fig. 3에 나타내었다. 그러므로 CoMFA 모델AIV 뿐만 아니라, 이 직선 관계식($Pred. (p[Od]_{50}) = 0.839Obs. (p[Od]_{50}) + 0.885$, $n=15$, $s=0.182$, $F=125.481$, $q^2=0.855$ 및 $r=0.952$)으로도 결합 친화력이 현저히 개선된 냄새분자를 예측할 수 있을 것으로 믿어진다.

CoMFA 등고도: PLS 분석에 기초하여 결합 친화력이 큰 5($p(Od)_{50}=6.29$)와 12($p(Od)_{50}=5.65$)의 등고도를 Fig. 4에 각각 나타내었다. 입체장의 favor (초록색): disfavor (노란색)는 80:20 그리고 정전기장에서 음하전 favor (붉은색): 양하전 favor (파란색)는 80: 20의 비율로 각각 나타내었다. 분자 5에서는 cyclohexyl 고리상의 1번 탄소원자를 제외한 대부분의 위치에 입체적으로 큰 치환기가 도입될수록(초록색) 결합 친화력에 기여할 것으로 나타났다. 그리고 입체적으로 작은 치환기가 도입될수록(노란색) 또는 음하전이 큰 치환기가 도입될수록(붉은색) 결합 친화력에 기여할 것으로 예상된다. 그러나 결합 친화력 상수에 대한 기여비율(%)은 입체장 40.8%, 정전기장 14.6% 그리고 소수성장(ClogP)이 44.6%이므로 정전기장에 의한 기여도 보다 입체장과 소수성장이 훨씬 크게 기여함을 나타내었다. 그러므로 분자 12에서도 phenyl 고리상 ortho, meta 및 para-위치의 넓은 영

역에 입체적으로 큰 치환기가 도입될수록(초록색) 결합 친화력에 기여할 것으로 나타났으며 para-위치는 공간적인 배향에 따라 각각의 등고도에 적합한 치환기들의 도입을 통하여 활성이 개선될 것으로 설명된다.

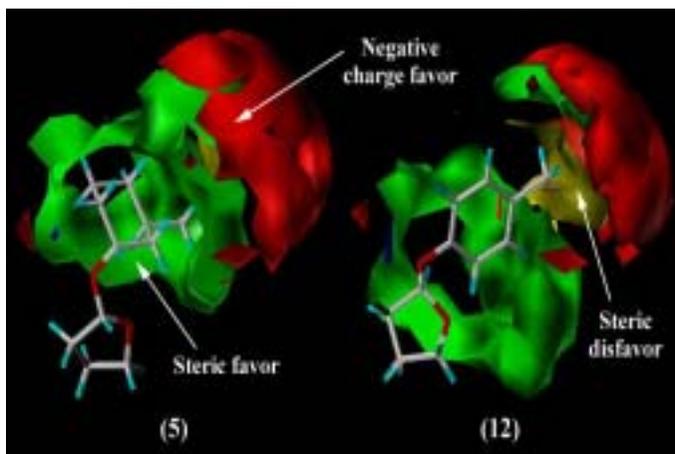


Fig. 4. The contour plots of the CoMFA (atom based fit) steric and electrostatic fields (stdev*coeff) for binding affinity between pOBP and odorant molecules, (5) and (12).

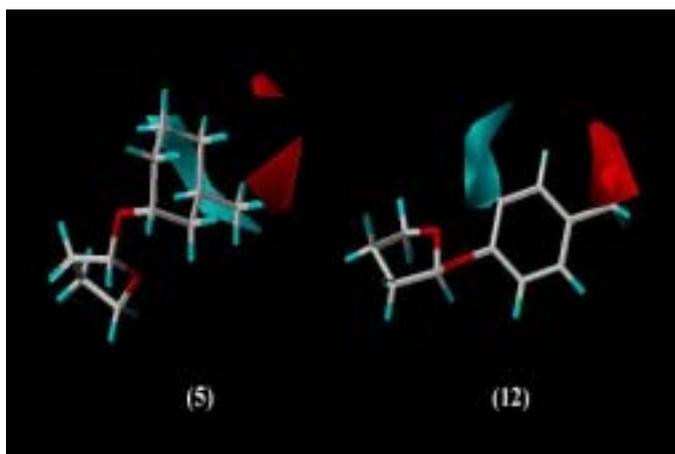


Fig. 5. CoMFA-HINT contour map for hydrophobic field (stdev*coeff) for binding affinity between pOBP and odorant molecules, (5) and (12). Cyan color denotes the contribution to hydrophobicity while red color signifies contribution to hydrophilicity.

CoMFA-HINT등고도: pOHP에 대한 결합 친화력이 비교적 큰 화합물은 3,7-dimethyloctan-1-ol ($IC_{50}=0.3\mu M$)로 알려져(Pevsner 등, 1990)있으며 nutty odorant는 친화력이 불량하였으나 green odorant들은 양호한 경향을 나타낸다는 사실이 보고된 바 있다(Herent 등, 1995). Fig. 5에는 소수성(hydrophobic)장과 친수성(hydrophilic)장에 관한 CoMFA-HINT 등고도를 나타내었다. 분자 5에서 cyclohexyl 고리상 C3 및 C5 원자 사이의 공간에는 소수성(하늘색)이 클수록 결합 친화력이 증가하며 3-methyl 기 부근은 친수성(붉은색) 작용기가 치환될 경우에 결합 친화력이 개선 될 것임을 시사하고 있다. 그리고 12에서 ortho-위치는 소수성 그리고 para-위치 부근에는 친수성 작용기가 존재할 경우에는 결합 친화력이 개선될 것으로 예상된다. 이상과 같이, 선택된 CoMFA 모델Ⅶ의 등고도(Fig. 4 및 5) 특성으로부터 수용체인 pOBP와 기질 분자간 결합 친화력에 미치는 CoMFA장을 이해할 수 있을 뿐만 아니라, 결합 친화력 상수($p(Od)_{50}$)가 큰 분자를 설계하는데 요구되는 가치있는 정보를 얻을 수 있었다.

4. 결 론

생물학적 자극통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 웅성 페르몬성 분자를 탐색하고자 일련의 냄새 분자로서 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofurane 유도체들의 정량적인 구조와 수용체인 porcine odorant binding protein (pOBP)간의 결합 친화력 상수($p(Od)_{50}$)에 대한 비교 분자장 분석(CoMFA)을 실행하였다. 가장 양호한 CoMFA 모델 AIV ($r^2_{cv.}(q^2)=0.886$ 및 $r^2_{ncv.}=0.984$)은 기질 분자 내 입체중심(chiral center)의 절대배열이 $C_1(R), C_2(S)$ 인 분자를 atom based fit 방법으로 배열하였을 경우의 standard field와 indicator field가 조합된 CoMFA장의 조건에서 유도되었다. 이 CoMFA 모델은 입체장 40.8%, 정전기장 14.6% 및 소수성장 44.6%가 결합 친화력 상수에 영향을 미치는 요소임을 나타내었다. CoMFA 등고도의 분석 결과로부터 효과적인 결합 친화력 냄새분자를 수식하는데 몇 가지 가치있는 정보를 얻을 수 있었다.

제 5 절 돼지 페로몬 성 물질의 탐색: Salivary Lipocalin으로부터 분자 동역학적 모의실험과 Virtual Screening

1. 서 론

가축들을 생물학적으로 통제하여 수급조절 수단으로 활용하기 위하여(Rekwot 등, 2001) 돼지 페로몬성 냄새를 발현하는 대체 물질의 탐색에 관한 연구의 목적으로 porcine nasal tissues 중에 존재하는 돼지 웅성 페로몬, 5 α -androst-16-en-3-one (또는 5 α -androst-16-en-3-ol)의 수용체로 알려진 lipocalin(Gower 등 1982)과 결합하는 비천연 리간드들과의 도킹에 관한 연구(Vincent 등, 2000)들이 느리기는 하지만 착실하게 연구되고(Herent 등, 1995) 있다. Odorant-binding proteins (OBP)는 코 cavity의 분비기관에 의해 표명되었고 휘발성인 소수성적인 분자 종류와 결합하며 후각의 transduction을 전달하는 것으로 추정된다(Buck, 2004). 모든 soluble biomolecules은 lipocalins의 large family에 속하며 비록 잘 알려지지 않는 기능의 달리 존재하는 members가 설명되어졌지만 일반적으로 aqueous biological fluids에 소수성적인 분자에 대한 전달체로서 수행한다. 최근에는 5-androst-16-en-3-one 및 5-androst-16-en-3-ol와 수용체사이의 결합기작에 관하여 연구된 바도 있다(Chen 등, 2003). 본 연구에서는 돼지 웅성 페로몬성 대체 물질을 탐색하기 위하여 돼지 웅성 페로몬의 수용체로 알려진 lipocalin(1GM6)에 대한 다양한 화합물과의 virtual screening(May 등, 2003; Kitchen 등, 2004) 실시하고 검토하였다.

2. 재료 및 방법

Androstenone과의 도킹(Docking)실험: 이미 X-선 결정구조가 알려진 1GM6 (Salivary lipocalin from Boar) 구조(Spinelli 등, 2002)에 sybyl module인 FlexX program을 사용하여 androstenol and androstenone을 automated docking을 수행하였으며, cavity로 알려진 pocket에 결합됨을 알 수 있었다. 또한 FlexX로 automated docking ligand를 이 위치에서 Molecular mechanics(MM)을 이용하여 최적화를 수행하여 잔기와의 restrain을 제거하였다. 이때 Ca 원자들은 constrain을 주었으며 결사슬은 ligand 중심을 변경 10Å으로 최적화(minimization)를 수행하여 ligand와의 restriction을 제거하였다. 기질 분자로 3만여개의 Chembridge product library를 대상으로 virtual screening을 실시하여 Score (Kcal/mol)가 낮아 도킹이 잘 되는 화합물 7개를 선정하였다.

3. 결과 및 고찰

활성자리; 활성자리의 pocket 하단에 polar group인 GLU121과 H-binding을 할 수 있는 TYR123 amino acid가 존재하고 있다. GLU121과 TYR123간의 거리는 2.41 Å으로써 강력한 수소결합을 형성하고 있으며 페르몬의 polar Group이 binding 할 수 있는 역할을 하고 있음을 예상할 수 있으며 pocket 외벽을 구성하고 있는 PHE60, 58, 93은 외벽의 rigidity와 친유성을 가지고 있으므로 결합부위의 결합하고 있는 분자의 크기, 형태, 화학, 약리학적인 범위를 결정하고 있음을 알 수 있으며 이들 특성들이 매우 제한적일 수 있음을 예상할 수 있다. 또한 결합부위의 부피는 약 274\AA^3 이며 LogP값은 15.458이다. FlexX를 사용하여 결합한 페르몬은 logP값은 3.819, 부피는 266\AA^3 으로써 부피 관점에서는 적당하다고 볼 수 있다. 또한 Fig.1 및 Fig.2에서는 활성자리에 구조가 결합되어 있는 그림이며 여기에서 구조상 결합의 특이점은 C=O group이 반응 주3t의 위 아래로 배열된 2가지의 binding mode를 나타내고 있는 점이다.



Fig. 1. Conformational changes in loop2.

활성자리의 특징 중, active site의 내부에 glycerol이 결합되어 있었으며 그 입구는 닫혀있는 구조로 되어 있다. 이러한 구조는 ligand가 결합된 후 입구가 닫히는 것으로 추측할 수 있으므로 결합전에는 입구가 열리게되며 결합한 후에는 닫히는 것을 예상할 수 있다. 즉, plapping effect에 의해서 열림과 닫힘이 발생하는 것으로 예상할 수 있으며 pocket의 위부분에 2개의 베타 sheet를 연결하고 있는 TYR87, TRY88, GLY89로 형성된 loop부분과 Asp30-Val43으로 구성된 loop영역들이 pocket 입구의 문 역할을 할 것으로 보여진다.

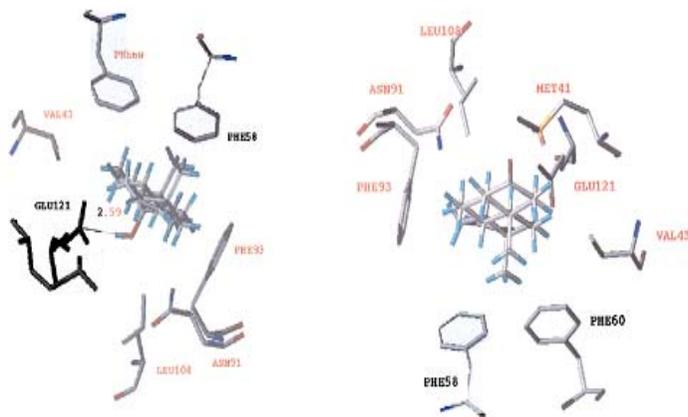


Fig. 2. Best FlexX docking poses for 1 and 2.

이로 인한 active ligand들의 크기에 상당한 영향을 미칠 것으로 예상된다. 또한 이러한 receptor flexibility가 ligand 설계에서 가장 문제가 될 부분이라 생각된다. 이 결정구조에 ligand가 결합되어있는 구조가 없어서 sybyl의 FlexX Program을 이용하여 돼지 성 페로몬으로 알려진 5 α -androst-16-en-3-one과 5 α -androst-16-en-3-ol을 결합하여 이들의 binding key residues를 찾아보았다. 그 결과, cavity의 벽은 주로 소수성적인 잔기인 Val45, Phe58, Ala73, Val85, Phe93, Leu106, Leu108들로 구성되어 있으며 약한 극성잔기인 Tyr87, Tyr123, Cys175으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

원래의 crystal structure은 Glycerol이 Cavity에 결합된 구조로써 pocket입구가 닫혀있는 구조로 나와 있다. 이러한 구조로는 ligand가 결합할 수 없는 구조임을 알 수 있었다. 이러한 protein에 ligand를 결합하기 위해서는 cavity의 형태 변화를 고려하여야만 하였다. 이러한 binding pocket 입구주위에 존재하는 loop들의 움직임을 연구하기 위해서 loop들을 조사하였다. cavity 주위에는 2개의 loop들이 존재한다. loop 1은(Tyr87, Tyr88, Gly89) 그리고 loop 2 (Asp30, Glu37, Asn38, Gly39, Ser40, Met41, Arg42, Val43)이며 이들 loop들의 flexibility는 2개의 β -sheet를 연결하고 있는 3개의 아미노산들로 구성되어진 loop 1보다 14개의 아미노산들로 구성되어진 loop 2의 flexibility가 더 좋을 것으로 고려된다. 이러한 사실을 바탕으로 이들 loop들의 형태변화를 Sybyl module에 있는 프로그램을 이용하여 이들 loop들의 변화를 예측하였다. Fig.1에서 보듯이 loop 2는 원래의 구조와는 달리 상당히 변형되어 binding pocket의 입구가 열려 있을 수 있다는 가정을 예상할 수 있으며 이에 따라 binding pocket의 형태도 달라짐을 예측할 수 있었다.

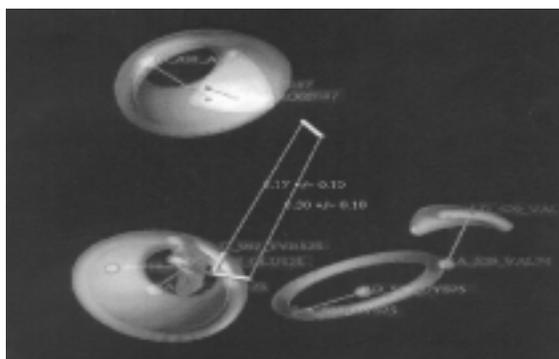


Fig. 3. Structure-based query

활성자리 결합양상; 활성 자리의 결정구조에는 glycerol이 결합되어 있었으며 cavity는 입구가 닫혀있었다. 이러한 현상은 ligand가 결합하기 전에는 cavity가 열려있었다가 결합 후에는 닫힌다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 이러한 plapping effect는 cavity 주위의 loop의 움직임에 의해서 일어날 수 있다. 이러한 단백질의 ligand binding을 연구하기 위해서는 cavity 주위의 형태변화를 고려하여야만 하였다. 이러한 binding pocket 입구 주위에 존재하는 loop들의 움직임을 연구하기 위해서 loop들을 조사하였다. cavity 주위에는 2개의 loop들의 존재를 Fig. 1에 나타내었다. loop 1은 Tyr87, Tyr88 및 Gly89 그리고 loop 2는 Glu37, Asn38, Gly39, Ser40, Met41, Arg42 및 Val43이며 이들 loop들의 flexibility는 2개의 β -sheet를 연결하고 있는 3개의 아미노산들로 구성되어진 loop 1보다 13개의 아미노산들로 구성되어진 loop 2의 flexibility가 더 좋을 것으로 고려된다. 이러한 사실을 바탕으로 이들 loop들의 형태변화를 Sybyl module에 있는 프로그램을 이용하여 이들 loop들의 변화를 예측하였다. Fig 2에서는 -ol 형태와 -one 형태를 활성자리에 결합 하였다. 위의 결과에서 pocket을 구성하고 있는 잔기는 liphophilic한 특성을 가진 Phe, Val, Leu으로 구성되어 있으며 pocket의 하단부에는 강한 수소결합을 형성할 수 있는 Glu가 위치하고 있다. -ol의 경우에는 구조상의 OH group과 Glu의 CO₂와 수소결합을 형성하고 있음을 알 수 있으나, -one의 경우는 Glu의 CO₂ group과 구조상 C=O group간의 정전기적인 반발로 인하여 구조의 C=O group이 -ol인 경우와는 반대로 pocket의 위쪽으로 배향하고 ligand의 탄소고리가 pocket 안쪽으로 배향되어 있었다. 이러한 결과들은 FlexX binding score가 각각 -6.78kcal/mol 및 -4.5kcal/mol임을 보이고 있다. -ol의 경우가 훨씬 더 유리한 binding mode를 가짐을 알 수 있었다. 이러한 결과들로 인하여 활성자리의 결합 유발효과는 pocket 하단부의 Glu와 수소결합 혹은 정전기적인 상호작용과 pocket을 구성하고 있는 잔기들과의 liphophilic interaction임을 알 수 있었다. 이러한 유발효과들을 고려하여 새로운 ligand를 찾는 데 기준점이 될 것이라 생각된다.



Fig. 4. Binding mode of AQ6060 in active site of lipocalin.

새로운 구조의 탐색; Active pocket에 결합하는 androstenol과 androsenone의 binding mode를 기준으로 sybyl의 unity program을 사용하여 Fig 3와 같이 Tyr87은 H-bond acceptor와 donor 그리고 Arg62, Cys75, Val74 그리고 Tyr123, Glu121은 RD(receptor donor), LA(ligand acceptor)로 query를 정하였다. 이와 같은 query를 가지고 sybyl의 Unity program을 이용하여 새로운 ligand를 찾았다. 그 결과, 아래 Fig 2와 같은 화합물들이 탐색되었으며 이들 화합물들은 FlexX를 사용하여 receptor에 결합하여 이들의 binding mode들을 비교하였다.

Table 1. The results of Flexx docking and volume of candidated compounds from UNITY search.

Compound number ^{a)}	Score ^{b)}	Volume ^{c)}	ClogP ^{d)}
AQ6431	-39.9	235.4	2.26
AQ5755	-39.4	227.4	2.96
AQ7111	-39.0	233.0	0.55
AQ7113	-38.5	253.6	1.85
AQ6060	-38.1	182.0	0.01
AQ6184	-37.6	204.2	0.54
BQ6663	-52.7	400.5	3.61

^{a)}Chembridge product library (<http://chembridge.com>), ^{b)}in Kcal/mol, ^{c)}in Å³, ^{d)}hydrophobicity.

그 결과, 3만여개의 물질 중에서 7개의 후보물질이 검색되어 이들의 binding mode를 비교하면 7개 중, 6개의 후보물질은 Glu121, Tyr123과 수소결합을 형성할 수 있는 H-bond donor 혹은 acceptor group을 화합물 말단에 가지고 있다. 특이하게도 이러한 수소결합 받게 혹은 주게을 가지지 않고 순수하게 lipophilic interaction만으로 결합할 수 있는 후보물질이 선택되었다. Table 1에 이들 후보물질들의 FlexX binding score에서 보듯이 순수하게 lipophilic interaction만으로 결합한 후보물질의 score 역시 다른 것에 비해서 좋음을 알 수 있었으며 ligand의 부피가 182 Å³으로써 포켓의 부피 273 Å³와 비교할 때 아주 적절함을 알 수 있었다. 한 예로 Fig. 4에는 lipocalin의 활성자리에 도킹된 AQ6060의 결합양상을 나타내었다.

4. 결 론

Androstenol과 androsenone의 binding mode를 기준으 RD(receptor donor), LA(ligand acceptor)로 query를 정하여 새로운 ligand를 찾았다. 이들 화합물들은 FlexX를 사용하여 receptor에 결합하여 이들의 binding mode들을 비교한 결과, 3만여개의 물질 중에서 7개의 후보물질이 검색되었다. 이 중, 6개의 후보물질은 Glu121, Tyr123과 수소결합(Taylor 등, 1984)을 형성할 수 있는 H-bond donor 혹은 acceptor group을 화합물 말단에 가지고 있을 뿐만 아니라, 특이하게도 이러한 H-bond donor 혹은 acceptor group을 가지지 않고 순수하게 소수성적인 상호작용만으로 결합할 수 있는 AQ6060을 위시한 후보 물질 7개의 화합물들이 선택되었다.

제 6 절 돼지 페로몬 성 물질의 예측과 Tetrahydrofuranyl-oxycyclohexane 유도체의 합성

1. 서 론

Porcine odorant binding protein (*p*-OBP)에 대한 결합 친화력이 비교적 큰 화합물은 3,7-dimethyloctan-1-ol ($IC_{50}=0.3\mu M$)로 알려져(Pevsner, 1990)있으며 nutty odorant는 친화력이 불량하였으나 green odorant들은 양호한 경향을 나타낸다는 사실이 보고된 바 있다(Herent 등, 1995). 근래, 돼지 후각세포 중, *p*-OBP와 냄새 분자인 2-(cyclohexyloxy tetrahydrofurane 유도체들 사이의 결합 친화력 상수($p[Od.]_{50}$)에 관한 정량적인 구조와 활성 관계(SAR)(Akamatsu, 2002)로부터 가장 중요한 단서들을 생물학적인 통제 수단으로 활용하기 위한 연구가 보고되고 있다. 여기에서는 돼지 페로몬 성 냄새 분자의 리간드를 탐색하고 설계하고자(Hansch 등, 1995) HQSAR (Lowis, 1997), CoMFA 및 CoMSIA 등, 3D-QSAR 모델로 선택된 tetrahydrofuranyloxycyclohexane (TFC-A 및 TFC-B)와 virtual screening에서 선택된 AQ6060을 포함한 3개의 화합물을 선정하고 이 중에서 가장 높은 결합 친화력 상수를 나타낼것으로 기대되는 TFC-A 유도체의 합성에 대하여 검토하였다.

2. 재료 및 방법

고 활성 화합물의 예측: 돼지 후각의 근육 조직으로부터 분리 정제한 *p*OBP (22kDa)와 구조상 비슷한 연관성을 갖는 다양한 유기 화합물 중에서 2-cyclohexyloxytetrahydrofurane 및 2-phen-oxytetrahydrofurane 유도체(Pevsner 등, 1990)들의 구조변화에 따른 관측된(obs.) 결합 친화력상수($p[Od.]_{50}$) (Dal Monte 등, 1993) 사이의 3가지 QSAR 모델(Sybyl, Ver. 7.1)을 유도하였다(성 등, 2005; 2006). 그리고 3가지 유형의 oxytetrahydrofurane (A), 2-(cyclohexyloxy)tetrahydrofurane (B) 및 2-(phenoxy)tetrahydrofurane (C) 유도체들에 대하여 optimized QSAR 방법(Cycle: 2000, Hit: 400)으로 약 1천여개의 치환체들에 대하여 결합 친화력상수($Pred.p[Od.]_{50}$)를 계산하였다. 또한, Chembridge library의 3만여개 화합물을 대상으로 한 virtual screening에서 선택된 화합물 중에서 가장 양호한 결합 친화력 상수가 예측된 AQ6060를 위시하여 tetrahydrofuranyloxycyclohexane (TFC-A 및 TFC-B) 유도체 등, 최종적으로 3개의 돼지 페로몬 성 화합물을 선정하였다.

시약 및 기기: 합성에 사용한 시약들은 대부분 Sigma-Aldrich 사의 1등급 시약만을 건조 또는 정제하지 않고 그대로 이용하였으며 유기용매는 부분적으로 정제하여(Perrin 등, 1988) 사용하였다. 특히, tetrahydrofuran(THF)은 Na 금속을, methylene chloride(MC)는 Ca금속을 이용하여 증류하여 사용하였다. 그리고 합성물의 구조확인을 위하여 NMR spectra는 Varian 400 MHz 모델로 측정하였다.

활성 화합물의 합성: 3가지 QSAR 모델의 예측 결과와 virtual screening에서 선택된 화합물 중에서 가장 높은 결합 친화력 상수를 나타낼 것으로 기대되는 페로몬 성 화합물 중, 하나를 합성하기 위하여 출발 물질로 cyclohexanecarboxylic acid를 methanol 용액속에서 thionylchloride와 반응시켜 methyl ester를 얻은 다음에 최종 생성물, tetrahydrofuran-*o*-cyclohexane (TFC-A) 유도체가 합성되는 과정을 Scheme 1에 정리하였다.

3. 결과 및 고찰

3D-QSAR 모델: 입체배열이 $C_1'(R), C_2(S)$ 인 경우, 가장 양호한 CoMFA 모델은 $C_1'(R), C_2(S)$ 의 조건과 atom based fit(AF) 정렬에서 유도된 모델이었다. 선택된 모델(성 등, 2006)은 상관성을 의미하는 non-cross-validation $r_{ncv}^2=0.984$ 와 표준오차 $s=0.086$ 그리고 예측성을 나타내는 LOO cross-validation r_{cv}^2 값 (또는 q^2)이 $r_{cv}^2=0.886$ 이었으며 결합 친화력 상수에 미치는 요소는 입체장 40.8%, 정전기장 14.6% 그리고 소수성장(ClogP)이 44.6% 이었다. CoMSIA 모델중(성 등, 2006b)에서 특히, 선택된 모델은 공통적으로 atom based fit 정렬과 grid 1Å 조건에서 지방족 화합물만을 대상으로 한 입체장 및 소수성장이 조합된 모델(조성수=2, $n=11$, $r_{cv}^2=0.613$, $r_{ncv}^2=0.904$, SEE= 0.255 및 F=37.68) 그리고 data set을 대상으로 소수성장의 조합 조건에서 유도된 모델(조성수=3, $n=15$, $r_{cv}^2=0.692$, $r_{ncv}^2=0.928$, SEE=0.197 및 F=47.042)들에 비하여 현저히 양호한 모델임이 확인되었다. 이와 같은 방법으로 각 입체배열 중에서 가장 양호한 모델 들을 선택하였다. 모든 모델을 비교한 결과, 입체중심이 $C_1'(R)$ & $C_2(S)$ 인 조건에서 유도된 모델이 가장 양호한 모델이었다.

Table 1. Statistical values and contribution fraction of the optimized 3D-QSAR and HQSAR models

Statistical & fraction	CoMFA ^{b)}	CoMSIA ^{b)}	HQSAR ^{c)}
Fields	Sta	Ste	-
Number of used compounds ^{d)}	12	12	12
Space grid (Å)	1.0	1.5	-
Number of components	2	2	5
F value ^{f)}	281.44	122.09	
$r_{cv.}^2(q^2)^g)$	0.886	0.856	0.916
$r_{ncv}^2)^h)$	0.984	0.964	0.988
Standard error estimate (ncv.) ⁱ⁾	0.086	0.129	0.094
Arts ^{j)}	0.068	0.088	0.057
Steric field	0.408	1.000	-
Electrostatic field	0.146	-	-
Hydrophobic field	0.446	-	-

Abbreviation: Sta=standard, and Ste=steric, ^{a)}optimal value of SL; 1.418., ^{b)}atom based fit alignment, ^{c)}molecular fragment; 5~8 and best length; 97, ^{d)}number of training set compounds, ^{f)}fraction of explained versus unexplained variance, ^{g)}cross-validated r^2 , ^{h)}non-cross-validated r^2 , ⁱ⁾standard error estimate, ^{j)} substituent lipole, ^{k)}rotatable bond account, ^{l)}average residual of training set.

HQSAR 모델: 홀로그래피적인 정량적 구조-활성관계(HQSAR)에 관한 분석 (Lowis, 1997)으로부터 좋은 HQSAR 모델을 얻기 위하여 먼저, training set 화합물에 대한 fragment size의 영향을 조사하였다. 그 결과, 가장 좋은 HQSAR 모델(성 등, 2005)은 분자조각 크기가 5-8 그리고 best length 307 bin, 주성분 수는 4이고 예측성은 $q^2=0.900$ 그리고 상관성이 $r_{ncv.}^2=0.982$ 로 매우 양호하였다. 그리고 조각의 크기(5-8)에 대한 변화가 모델을 통계적으로 개선하지 않고 있다. 따라서 분자 조각의 특징에 관한 영향을 조사한 결과, 분자 조각의 특징중에서 입체성에 관한 키랄성(chirality)이 가장 중요한 요소이었으며 best length가 97일 경우에 주성분 수는 5이고 예측성은 $q^2=0.916$ 그리고 상관성이 $r_{ncv.}^2=0.988$ 으로 가장 양호한 모델을 유도하였다. 그러므로 냄새 분자(키랄탄소 원자의 수: A=2-4 및 B=1-2)와 돼지 후각 수용체인 OBPs 사이의 효소-기질간 반응이 키랄성에 의존성을 나타낸다는 사실은 이들 반응이 비 대칭적으로 이루어 지고 있음을 시사한다.

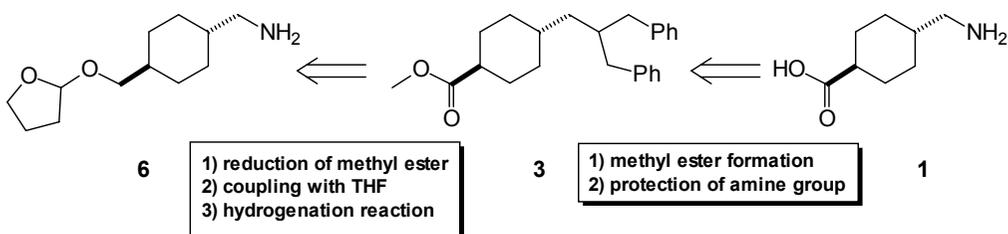
중간체 3의 합성; 100 ml 둥근 플라스크에 methanol (30 ml)을 넣고 ice-bath 온도 조건하에서 SOCl_2 (10 ml)를 천천히 적가하였다. (주의: SOCl_2 첨가시 매우 격한 반응이 이루어 지므로 최대한 천천히 적가 하여야 한다.) 30분 동안 상온에서 반응액을 충분히 교반 시킨 후, 출발 화합물 4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid, **1** (5.0 g, 31.8 mmol)을 고체상태로 천천히 첨가 하였다. Carboxylic acid, **1**의 첨가가 끝난 후에도 반응액 중에 carboxylic acid가 완전히 녹지 않지만 천천히 녹기 시작해 하루밤 동안 방치하였다. 진공펌프로 충분한 시간 동안 과량의 SOCl_2 와 methanol 용매를 완전히 제거하고 얻어진 흰색 고체를 최소량의 methanol에 녹인 다음에 과량의 차가운 diethyl ether를 넣어 흰색고체로서 crude methyl ester, **2** (6.5 g)을 얻었다. 얻어진 crude methyl ester, **2** (6.5 g)와 K_2CO_3 (8.8 g, 63.6 mmol)을 THF/ H_2O (1:1)의 수용액에 넣고 교반 시키면서 benzyl bromide (7.6 ml, 70.0 mmol)를 ice-bath상에서 천천히 10 분간 적가 하였다. 반응액은 상온에서 over night시켜 충분히 반응시킨 후, 과량의 ethyl acetate와 물을 첨가하고 pH 6.0 조건에서 세 차례 이상 추출하여 유기층 만을 분획 추출하여 얻었다. 얻어진 유기층은 과량의 무수 Na_2SO_4 로 소량의 물을 제거한 후, 감압 증류하여 농축 시키고 액상으로 crude methyl ester **3**을 얻었다. 액상형의 methyl ester, **3**을 ethyl acetate와 n-hexane 용매 조건으로 SiO_2 column chromatography하여 yellow oil의 methyl-4-((dibenzylamino)methyl)cyclohexanecarboxylate, **3** (10.2 g)을 92%(in 2 steps)의 수율로 얻었다.

3: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) d 0.78 (q, $J=12.0$ Hz, 2H), 0.94 (q, $J=12.0$ Hz, 2H), 1.38 (m, 1H), 1.46 (s, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.80 (d, $J=12.0$ Hz, 2H), 1.94 (d, $J=12.0$ Hz, 2H), 2.22 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.44 (bd, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.54 (s, 4H), 7.23~7.740 (m, 10H)

화합물, tetrahydrofuran-2-ylmethylamine (**6**)은 THF로 coupling하여 4차 methyl amine 형성 반응을 통하여 얻을 수 있으며 methyl ester, **3**를 LiAlH_4 를 경유하여 alcohol로 환원시켰다. 그 다음에 THF solvent 내에서 THF 골격을 coupling 시키고 dibenzyl protection group을 Pd/C 촉매 조건하에서 수소화 반응을 통하여 amine, **6**을 얻을 수 있을 것으로 판단하였다. 따라서 methyl ester, **3**은 4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid, **1**을 출발물질로 하여 MeOH 용매 조건에서 SOCl_2 와 반응을 통해 methyl esterification 반응을 시도하고 free amine에 대하여 benzylation protection 반응을 통해 얻을 수 있었다.

TFC-A의 합성: Crude amine, **6** (500 mg, 2.3 mmol)을 CH₃CN (15 ml)에 녹이고 K₂CO₃ (640 mg, 4.6 mmol)과 iodomethane (3.3 g, 23.0 mmol)을 반응 시켰다. 반응 용액에 brine을 첨가하여 세척한 후, 세 차례 이상 methylene chloride로 추출하였다. 이렇게 얻어진 유기층을 과량의 무수 Na₂SO₄로 소량의 물을 제거한 후 감압 증류하여 고체상의 crude amine를 얻었다. 얻어진 amine을 ethyl acetate와 n-hexane 용매 조건으로 SiO₂ column chromatography하여 목적하는 기질 화합물, tetrahydrofuranoxycyclohexane (TFC-A) (380 mg)을 얻었다.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.72~0.98 (m, 4H), 1.42 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.75 (d, J=12.0 Hz, 2H), 1.80~1.92 (m, 2H), 1.94 (d, J=12.0 Hz, 2H), 2.22 (d, J=7.2 Hz, 2H), 2.27 (s, 9H), 3.44 (bd, J=5.6 Hz, 2H), 3.55~3.78 (m, 4H), 5.10 (t, J=6.2 Hz, 1H).



Scheme 1. Synthetic process of tetrahydrofuranoxycyclohexylmethylamine analogues.

4. 결론

돼지 응성 페르몬 성 분자를 탐색하고자 일련의 냄새 분자로서 2- (cyclohexyloxy) tetra-hydrofurane 유도체들의 정량적인 구조와 수용체인 porcine odorant binding protein에 대한 결합 친화력 상수($p(\text{Od})_{50}$) 사이의 HQSAR 및 3D-QSAR 모델과 virtual screening으로 예측을 실행하였다. 그 결과, 가장 양호한 결합 친화력 상수가 예측된 총 3개의 돼지 페르몬 성 화합물을 선정하고 그 중에서 한 화합물(TFC-A)을 합성하였다. cyclohexanecarboxylic acid를 출발 물질로 하여 MeOH 용매 조건에서 SOCl₂와의 반응으로 methyl esterification 반응을 시도하고 그리고 free amine에 대하여 benzylation protection 반응을 시도

하였다. dibenzyl protection은 일반적인 염기 조건에서 benzyl bromide와의 coupling 반응으로 각각의 functional group들이 protection된 methyl ester를 얻을 수 있었다. 합성된 methyl ester를 알콜로 환원시키는 반응은 비 선택적으로 진행하였다. Dibenzyl 보호기의 탈 보호 반응은 Pd/C을 촉매로 사용한 수소화 반응으로 진행되었으며 tetrahydrofuranyloxycyclohexane (TFC-A) 유도체를 합성하였다.

제 7 절 돼지 페로몬 성 물질의 실증실험; Tetrahydrofuranyl-oxycyclohexane 유도체와 androstenone의 독성 예측과 페로몬 특성

1. 서론

발정기를 자극하는 숫 돼지의 부재와 발정기의 탐지나 도움이 없이 홀로 암 돼지를 사육하는 것은 생산성을 감소시키는 매우 중요한 요인이며 숫 돼지에게 암돼지의 노출은 50~ 90%의 교배율을 확연하게 증가시킨다고 알려졌다(Hemworth 등, 1982). 몇몇의 연구에서 숫 돼지의 노출은 이유한 모돈에서 재교배의 기간을 줄이는 것에 이용된다고 보고되었다(Signoret, 1970; Stevenson 등, 1984; Petchy 등, 1980). 근래, 생물학적인 통제에 관한 보고에 따르면, 숫 돼지 페로몬 스프레이의 사용이 돼지의 재생산과 효율성 측면에서 유의할 만한 개선이 있었다고 하였다(Shrestha 등, 2001). 최근에는 숫 돼지 sex odor aerosol (SOA)의 비 효율성을 극복하고자 페로몬성 대체 물질들의 탐색(성 등, 2006a)에 관하여 연구한 바 있다. 여기에서는 androstenone과 합성된 tetrahydrofuranyloxycyclohexane (TFC-A 및 TFC-B) (성 등, 2006b) 및 virtual screening product인 AQ6060(성 등, 2006c)에 대하여 소기의 목적으로 활용할 수 있는지 여부를 우선 판단하기 위한 여러 가지 독성치를 예측하고 그 중에서 가장 결합 친화력 상수가 높을 것으로 예측되었던 TFC-A에 대한 돼지 페로몬 특성에 관하여 검토하였다.

2. 재료 및 방법

다양한 독성의 예측: Tetrahydrofuranyloxycyclohexane (TFC-A 및 TFC-B) 및 virtual screening product인 AQ6060의 급만성 독성을 예측하거나 평가(정확도: 85% 이상)하기 위하여 Health Design Inc.(HDI)에서 개발된 TOPKAT (Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology) 프로그램 (Ver. 6.2, Accerys. Inc)을 이용하여 미국 연방식품 의약국(FDA)이 규정한 설치류 발암성 (RC), Ames 돌연변이성(AM), 잠재적 독성 발현지수(DPT: developmental toxicity potential), 쥐 경구독성(LD₅₀) 및 피부 감작성(skin irritant) 등, 여러 항목들의 독성값들을 예측하였다.

시약의 조제: Sigma제 1급시약 androstenone과 합성된 TFC-A를 사용하여 돼지 페로몬 성 실험용 용액을 제조하였다. 이들 화합물은 상품화 된(PBS) 제품

(SOA: Intervet, Boxmeer, The netherlands)의 경우(androstenone: 0.28mg/75ml)와 동일한 농도(1.29×10^{-5} Mole)조건인 0.5% tetrahydrofuran (THF) 수용액을 제조하여 실험하였다. SOA 1개는 암 돼지에 2초씩 분사 할 경우, 약 30번 사용할 수 있도록 스프레이 캔으로 제조되어있다.

폐로몬 실증시험; 선택된 화합물의 여러 가지 독성예측 결과, 설치류 발암성(RC), Ames 돌연변이성(AM), 잠재적 독성 발현지수(DPT) 등이 음성으로 예측된 화합물에 대하여 돼지에 대한 폐로몬 성 접촉 시험을 실시하였다. 합성물이 상품화 된 제품(SOA)의 경우와 같은 농도(Mole) 조건에서 발정 징후를 발현 할 것이라는 전제하에 우선 반응성을 타진하고자 정성적으로 실시하였다. 8개월령의 랜드레이종 15두에 SOA와 동일한 농도(1.29×10^{-5} Mole)조건인 TFC-A의 0.5% THF 수용액을 각각 처리하였다. 대조군 15두는 처리하지 않았다. 돼지의 발정주기가 21일인 점을 감안하여 하루 약 2회씩 14일 동안, 초산돈의 코에 2초간 분사 방식으로 합성물 용액에 대한 접촉시험을 정성적으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

화합물들의 독성예측: Tetrahydrofuranoxycyclohexane (TFC-A 및 TFC-B) 및 virtual screening product인 AQ6060 등, 화합물들을 대상으로 미국 연방 식품의약국(FDA)이 규정한 설치류 발암성, Ames 돌연변이성(AM), 쥐 경구독성(LD₅₀) 및 피부 감작성(skin irritation) 등의 예측된 독성 결과를 Table 1에 정리하였다. 독성 항목별 독성발현 기준은 다음과 같다. 즉, 설치류 발암성(RC)이 0.3 이하일 경우에는 발암 확률이 낮으나 0.7 이상은 발암 확률이 높은 것으로 간주하며 Ames 돌연변이성(AM)은 0.3-0.0 사이의 값 일때 돌연변이성 발현확률이 없는 것으로 평가한다. LD₅₀(g/kg)은 쥐의 경구독성치를 나타내며 잠재적 독성 발현수치(DPT)는 0.3 이하일 경우에는 발현확률이 매우 낮으나 0.7 이상인 경우에는 발현확률이 매우 높은 것으로 그리고 피부 감작성은 잠재적 독성 발현수치의 기준과 동일하게 0.7 이상이면 피부 감작성 발현확률이 매우 높은 것으로 평가한다.

Table 1. Predicted various toxicities of pheromonal compounds by CoMFA model and their predicted binding affinity constants

No.	Compounds.	Pred.p[od] ₅₀ ^{a)}	RC ^{b)}	AM ^{c)}	DTP ^{d)}	LD ₅₀ ^{e)}	Skin ^{f)}	logP ^{g)}
1	TFC-A	10.37	0.000	0.000 ^{h)}	0.000	3.2	0.999	1.944 ^{h)}
2	TFC-B	9.72	0.000	0.000	0.000	3.2	1.000	2.290 ^{h)}
3	AQ6060	6.02	1.000 ^{h)}	0.976	0.002	1.8	0.000 ^{h)}	0.550
4	Androstenone	-	0.987	0.000	0.000 ^{h)}	10.0	0.695 ^{h)}	3.795

^{a)}Predicted binding affinity constant by CoMFA model, ^{b)}rodent carcinogenicity, ^{c)}Ames mutagenicity, ^{d)}developmental toxicity potential, ^{e)}rat oral LD₅₀ (g/kg), ^{f)}skin irritation, ^{g)}hydrophobicity, ^{h)}exceeding confidence limits.

이 자료에 따르면 합성물, TFC-A 및 TFC-B는 설치류 발암성(RC)과 Ames 돌연변이성(AM) 및 잠재적인 독성 발현수치(DTP)에 대하여 모두 음성의 독성 예측값을 나타내었다. 그리고 쥐(rat)에 대한 경구 독성치(LD₅₀)는 3.2-1.8g/Kg 수준이었으나 피부 감작성(skin irritation) 발현 가능성이 매우 큰편으로 나타났다. 그러므로 여기에서 다른 독성치들이 대체로 낮은 경향이었기 때문에 대체 페로몬성 물질로 활용가능 할 것으로 예상된다. 그러나 AQ6060의 경우에는 설치류 발암성(RC)과 Ames 돌연변이성(AM) 발현 가능성이 있으므로 활용 가능성이 적어보인다.

페로몬 실증 시험: 숫 돼지 페로몬 스프레이는 집약적인 관리 조건에서 암퇘지들의 자극과 발정기 탐지의 목적으로 생산되었다(Reed 등., 1974; Krzymowski 등, 1999).

본 연구에서 합성된 페로몬을 8개월령의 랜드레이스종 15두에 14일동안 하루에 2회씩 2초간 코에 직접 분사한 결과 73%의 발정동기화 현상을 나타내었다. 그러나 합성 페로몬을 처리하지 않은 15두에서는 53%의 발정동기화 현상을 나타내었다. 이상의 결과에서 음성 페로몬을 처리할 경우 발정율이 20% 향상됨을 입증할 수 있었다.

4. 결 론

Virtual screening product인 AQ6060의 경우에는 설치류 발암성(RC)과 Ames 돌연변이성(AM) 발현 가능성이 매우 크므로 돼지 페로몬성 대체 물질로 활용이

불가능하다고 판단되었으나 선택된 화합물(TFC-A)은 설치류 발암성(RC)과 Ames 돌연변이성(AM) 및 잠재적인 독성 발현수치(DTP)가 모두 음성의 독성 예측값을 나타내었기 때문에 활용 가능 할 것으로 예상되었다. 합성물이 상품화된 제품(SOA)의 경우(0.28mg/75ml)와 동일한 농도(1.29×10^{-5} Mole) 조건에서 발정을 발현 할 것이라는 전제하에서 두 화합물을 암 돼지에 실험한 결과, 발정율이 20% 향상됨을 입증할 수 있었다. 그러나 본 합성물질을 실용화하기 위해서는 더 많은 정량적인 연구가 수반되어야 할 것이다.

제 8 절 종모돈의 정액성상, 동결-융해후 정자의 생존성, 혈청중 FSH, LH, Estradiol-17 β 및 Testosterone 농도에 미치는 품종과 계절의 영향

1. 서 론

오늘날 생명공학의 발달과 더불어 인간의 수명을 연장하기 위해서 동물을 이용한 장기생산 및 유용한 물질을 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 돼지는 인간과 해부·생리학적으로 비슷하기 때문에 연구의 대상동물로 많이 이용되고 있다. 앞으로 돼지를 이용한 생명공학의 연구를 진행하기 위해서는 동결정자의 이용이 필연적이다.

종모돈은 품종, 연령, 영양상태, 환경 그리고 채취빈도 등에 따라 정액생산의 영향을 받는다. Hughes 와 Varely(1980)에 의하면 돼지에서 정자는 생후 5-8개월부터 나타나며, 정액량은 18개월령까지 증가한다고 하였다. 이 시기에 정액량은 200-400ml이며, 전체 정자수는 $20-80 \times 10^9$ 이라고 보고하였다. Diehl 등(1979)은 1회 사출된 정액량은 평균 150-200ml, 정자수는 평균 $30-60 \times 10^9$ 이라고 보고하였다. Von Rohloff (1973)의 보고에 의하면 1세부터 4세까지의 종모돈에서 정액량은 차이가 없다고 하였다. 정액량과 정자수는 5세 이후부터 감소하고 품종간에 차이가 많은 것으로 나타났으며, Large White 와 같은 대형종이 정액량과 정자수가 많은 것으로 나타났다(Hughes 와Varely, 1980).

돼지 동결정액을 이용하여 처음으로 성공적인 수정결과를 얻었다는 Polge등(1970)의 보고가 발표되면서 많은 학자들에 의해서 돼지 동결정액에 관한 연구가 수행 되었다(Graham 등, 1978; Larsson, 1978; Pursel, 1979; Johnson, 1980). Pursel과 Park(1987)은 lactose-egg yolk 희석액을 이용한 5ml 스트로 동결정액 제조에 성공하였으며, 동결-융해 후 정자운동성은 37%, 정상침체 비율은 51%라고 보고 하였다.

돼지에서 정소의 발달, 정자형성 그리고 스테로이드 호르몬의 생산은 난포자극호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH)에 의해서 조절된다고 보고하였고(Schinckel 등;1984), 종모돈에서 혈장 FSH의 농도가 높을수록 정소크기가 작아지고 정자생산이 감소되는 경향을 보인다고 하였다(Lunstra 등, 1996; Ford 등 1997;

Zanella 등, 1999). 그러나 아직도 FSH에 의한 정자형성의 조절기전은 완전히 밝혀지지 않았다(Zirkin 등, 1994).

Romanowicz(1976)이나 FlorCruz와 Lapwood(1978)는 LH의 분비는 발육중인 수퇘지에서 변이가 심하다고 보고하였으나 Allrich 등(1981)은 나이에 영향을 받지 않는다 보고하였다. Allrich 등(1981)은 성장중인 수퇘지에서 혈장 estradiol-17 β 의 농도를 조사한 결과 40일령에 11.3pg/ml, 250일령에 114.2pg/ml을 나타내어 성장하면서 농도가 증가한다고 보고하였다. Mariscal 등 (1996)은 완전히 성숙한 수퇘지에서 testosterone 농도가 4.7-7.3ng/ml이라고 하였으며, Allrich 등 (1981)은 40일령에 1.31ng/ml을, 250일령에 15.76ng/ml을 나타낸다고 보고하였다.

본 연구는 종모돈의 정액성장, 동결-융해 후 정자의 생존성 그리고 혈청 중 FSH, LH, estradiol-17 β 및 testosterone 농도에 미치는 품종과 계절의 영향을 조사하여 우수한 종모돈의 선발을 위한 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시돈의 정액채취 및 검사

공시돈으로는 충남대학교 형질전환 복제돼지 연구센터 동물사육장에서 사육되고 있는 12-15개월령의 듀록(Duroc) 종모돈 4두와 요크셔 (Yorkshire) 종모돈 4두가 사용되었다. 봄, 여름, 가을 그리고 겨울의 정액성장조사 및 동결정액 제조를 실시하기 위하여 종모돈의 정액채취는 7일 간격으로 오전 9-10시 사이에 실시하였다. 정액은 200ml 보온병에 수압법으로 농후정자 부분과 희박정자 부분으로 나누어 채취하였으며 농후정자 부분만 사용하였다.

나. 동결정액의 제조 및 융해

동결정액의 제조는 Yi 등 (2002)이 보고한 방법에 의하여 실시하였다. 보온병에 채취한 농후정자부분은 실온 (20-23 $^{\circ}$ C)에서 2시간 동안 서서히 냉각시켰다. 15 ml 튜브에 농후정자부분의 정액을 취하고 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 정장을 제거하였다. 정장을 제거한 정자는 최종 정자농도가 1.0×10^9 /ml 되도록 lactose-egg yolk 그리고 N-acetyl- D-glucosamine (LEN)이 포함된 1차 희석액으로 5 ml 되도록 하여 재부유시켰다. 1차 희석정액은 5 $^{\circ}$ C 냉장실에서 2시간 보존 후 LEN+4% 글리세롤 희석액 (2차 희석액) 5 ml로 2차희석하여 총 정액량

이 10 ml 되도록 하였다. 상기와 같이 희석된 정액은 즉시 스트로 (Minitub GmbH, Landshut, Germany)에 5 ml씩 나누어 주입하여 봉인하였다. 주입 및 봉인된 스트로는 공기층을 가운데로 오게한 후 aluminum rack 위에 수평으로 놓은 후 액체질소 표면에서 5 cm 떨어진 곳에 수평으로 놓아 20분간 동결시킨 후 -196°C 의 액체질소통에 보관하였다. 액체질소통에 보관된 스트로는 52°C 수조에서 40초 동안 용해하였다.

다. 정자의 평가방법

용해된 5 ml 스트로와 75 ml BTS 희석액 (Pursel과 Johnson, 1975)을 실온에서 혼합한 직 후 0.5 ml씩 두 개의 표본을 취하여 한 표본은 37°C 에서 30분간 방치한 후 정자의 운동성을 조사하였다. 다른 한 표본은 침체평가를 위하여 1% glutaraldehyde 로 고정하였으며, Pursel과 Johnson (1974)의 방법에 의하여 정상 침체(NAR acrosome)를 위상차현미경하에서 $1,000\times$ 로 조사하였다.

라. 혈액의 채취 및 혈청 시료의 추출과 분석

혈액은 듀록과 요크셔 종모돈 각각 4두를 보정시킨 후 21 gauge 주사바늘을 사용하여 오전 9-10시 사이에 이 정맥에서 계절별로 채혈하였고, 채혈한 것은 5°C 로 냉각시켜 24시간 보관 후 4°C 에서 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리시켰으며, 혈청은 분석할 때까지 -20°C 에서 냉동 보존하였다.

혈청 FSH의 농도는 Bolt 등 (1981)의 방법대로 두 벌의 $250\ \mu\text{l}$ 의 시료를 사용하여 결정하였다. 항-돼지 FSH 항체는 1차항체로 사용하였고, 2차항체는 자유호르몬 중에서 결합된 호르몬을 분리하기 위해 사용하였다. 순수분리된 FSH는 방사성요오드화와 표준구로서 사용하였고, 이는 USDA-FSH-PPI이었다. 두 벌의 125, 250 그리고 $500\ \mu\text{l}$ 시료의 분석은 표준곡선을 평행하게 따랐다. 첫 번째 시료는 1,400, 1, 184, 그리고 1,359 pg/ml이고, 두 번째 시료는 각각 1,637, 1,316, 그리고 1,114pg/ml이었다. 실험 내 혹은 실험간 편차 공동계수는 각각 4.8%와 9.1%이었다.

혈청 LH의 농도는 Niswender 등(1970)에 의해 설명된 이중 항체 방사선면역 분석(double antibody radioimmunoassay, RIA)을 통해 $300\ \mu\text{l}$ 씩 두 벌을 만들어서 측정하였다. 순수 분리된 LH는 표준구로서 사용하였고, 방사성요오드화시키는데 사용하였다. LH는 클로라민 T 방법 (chloramines T method, Greenwood 등, 1963)으로 표지하여 컬럼크로마토그래피를 통해서 분리하였다. 항-돼지 LH 항체는 1차항체로 사용하였다. 실험내 혹은 실험간 편차 공동계수값은 평균적으로 각각 5.5%와 6.5%이었다.

혈청 E₂ 농도는 Britt 등 (1974)의 방법인 결합된 estradiol과 자유 estradiol의 이중 항체분리법을 이용하여 결정하였다. E₂ 항혈청 (Lilly no. 22673) 특이성은 Kesler 등 (1977)에 의해 보고된 바 있다. 첨가된 [³H]E₂의 회복율은 평균적으로 89%이고, 시료값은 실험상 손실을 고려하여 정정하였다. 두 별의 500 μ l 전체 혈청 시료는 4ml dimethylene chloride로 추출하였다. 돼지 혈장 (난소제거된 암퇘지, 4.2 pg/ml estradiol) 500 μ l로부터 첨가된 질량 (10, 25, 50 그리고 75 pg estradiol)의 회복율은 106 \pm 2%이었다. 시료부피 300, 500, 800, 1,000 그리고 1,400 μ l의 분석측정은 표준곡선을 평행하게 따랐고, 각각 56.5, 57.3, 55.2, 53.3 그리고 52.0 pg E₂/ml을 함유하였다. 실험 내 혹은 실험 간 편차 공동계수는 각각 5.5%와 5.8%이었다.

혈청 testosterone 농도측정을 위한 혈청시료의 추출은 혈청 50 μ l를 0.5ml의 diethyl ether에 넣고 vortex한 후 수층과 유기 용매층이 분리가 되면 유기 용매층을 조심스럽게 모아 증발시키며 건조시켰다. 유기 용매가 완전히 없어지면 EIA buffer 50 μ l를 넣었다. 분석시료는 Enzyme Immunoassay (EIA)법으로 다음과 같이 실시하였다. EIA kit (Cayman Chemical, USA)를 washing buffer로 3회 세척한 뒤, 각 well에 testosterone 표준액 또는 sample을 각각 50 μ l씩 가한 후 testosterone acetylcholinestrace tracer와 testosterone antiserum을 각 well에 50 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 흔들면서 반응시킨 후 washing buffer로 5회 세척한 후 Ellman's reagent를 넣고 1시간 동안 발색시켜 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 찍었다.

마. 통계처리

본 연구로부터 얻은 자료는 SAS package (1996)를 이용하여 분산분석을 하였으며, 처리간의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 종모돈의 품종별, 계절별 정액량 및 정자농도 비교

종모돈의 품종별, 계절별 정액량 및 정자농도는 Table 1에 나타난 바와 같이 요크셔종이 듀록종보다 봄, 여름, 가을, 겨울에서 정액량이 많았으며, 정액농도에서는 차이가 없었다. 계절별 정액량은 듀록 및 요크셔종에서 봄철이 여름, 가을 및 겨울철에 비하여 많았고, 정자농도는 차이가 없었다.

이상의 결과는 Hughes와 Vareley (1980) 그리고 Diehl 등 (1979)의 보고와 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 1. Comparison of semen characteristics between breeds and among seasons in boars

Breed	No. of boars	Semen volume (ml) ^{1, 2}				Sperm concentration ($\times 10^8$ /ml) ^{1, 2}			
		Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring	Summer	Autumn	Winter
Duroc	4	180.5 \pm 1 4.1 ¹	146.5 \pm 13.2 ^a	176.6 \pm 16.7 ^a	167.7 \pm 14.6 ^a	2.1 \pm 0.4	1.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.4	1.8 \pm 0.3
Yorkshire	4	276.3 \pm 21.5 ^b	290.6 \pm 26.8 ^b	289.8 \pm 24.5 ^b	255.4 \pm 22.7 ^b	2.2 \pm 0.4	1.6 \pm 0.3	1.7 \pm 0.4	2.0 \pm 0.4

¹ Spring (March-May), summer (June-August), autumn (September- November) and winter (December-February).

² Means \pm SE for six ejaculates from each of four Duroc and Yorkshire boars.

^{ab} Means \pm SE in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

나. 동결-융해 정자의 품종별, 계절별 정자운동성 및 정상침체 비교

동결-융해 정자의 품종별, 계절별 정자운동성 및 정상침체의 비율을 비교한 결과는 Table 2와 같이 듀록종과 요크셔종에서 각각 봄철에 생산한 정자가 여름,

Table 2. Comparison of motility and normal acrosome of frozen-thawed sperm between breeds and among seasons in boars

Breed	No. of boars	Motility(%) ^{1, 2}				Normal acrosome (%) ^{1, 2}			
		Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring	Summer	Autumn	Winter
Duroc	4	45.5 \pm 2.1 ^{ax}	20.4 \pm 1.0 ^{az}	39.5 \pm 2.4 ^{xy}	32.7 \pm 1.9 ^y	50.5 \pm 1.9 ^x	27.0 \pm 1.4 ^y	30.6 \pm 2.1 ^y	25.6 \pm 1.7 ^y
Yorkshire	4	56.0 \pm 1.2 ^{bx}	31.5 \pm 1.8 ^{by}	34.7 \pm 2.6 ^y	30.4 \pm 1.8 ^y	53.5 \pm 2.0 ^x	26.8 \pm 1.6 ^y	29.2 \pm 1.9 ^y	28.4 \pm 1.8 ^y

¹ Spring (March-May), summer (June-August), autumn (September -November) and winter (December-February).

² Means \pm SE for six ejaculates from each of four Duroc and Yorkshire boars.

^{ab} Means \pm SE in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

xyz Means \pm SE in the same rows of motility and normal acrosome, respectively, with different letters differ significantly (P<0.05).

가을 및 겨울철에 생산한 정자보다 동결-융해 후 정자운동성 및 정상침체 비율이 높았다. 한편 듀록종과 요크셔종에서 동결-융해 후 정자운동성은 모든 계절에서 요크셔종이 높게 나타났으나, 정상침체에서는 차이가 없었다. 이상의 결과는 정자의 내동성은 종모돈의 개체차이, 품종, 계절 등에 의해서 영향을 미친다는 Johnson (1985)의보고와 잘 일치하고 있다.

다. 종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 FSH 농도 비교

종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 FSH의 농도를 비교한 결과 (Table 3)는 요크셔종이 듀록종 보다 모든 계절에서 낮은 농도를 나타내었다. 그러나 두 품종 모두에게 각각 계절간에는 차이가 없었다.

이상의 결과는 종모돈에서 혈장 FSH의 농도가 높을수록 정소 크기가 작아지고 정자 생산이 감소되는 경향을 보인다는 Lunstra 등(1996), Ford 등(1997) 그리고 Zanell 등(1999)의 보고와 잘 일치하고 있다. 그러나 FSH에 의한 정자형성의 조절기전에 대하여는 아직도 더많은 연구가 필요하다.

Table 3. Comparison of serum FSH concentrations between breeds and among seasons in boars

Breed	Serum FSH concentrations (ng/ml) ^{1, 2}			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Duroc	204.8±17.3b	235.5±21.9b	223.4±23.6b	230.3±20.4b
Yorkshire	105.9±13.6a	126.3±17.4a	115.6±18.7a	112.4±19.8a

¹ Spring (March–May), summer (June–August), autumn (September– November) and winter (December–February).

² Means±SE for six ejaculates from each of four Duroc and Yorkshire boars. ab Means±SE in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

라. 종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 LH 농도 비교

종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 LH의 농도를 비교한 결과 (Table 4)는 요크셔종과 듀록종간에 차이가 없었다. 또한 두 품종 모두에서 계절 간에도 차이가 없었다.

이상의 연구결과는 LH의 분비는 발육중인 숫돼지에 있어서 변이가 심하다는 Romanowicz등(1976) 이나 FlorCruz 와 Lapwood(1978)의 보고와는 차이가 있으나 LH의 분비는 나이에 영향을 받지 않는다는 Allrich 등(1981)의 보고와 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 4. Comparison of serum LH concentrations between breeds and among seasons in boards

Breed	Serum LH concentrations (pg/ml) ^{1, 2}			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Duroc	890.8±21.0	798.7±23.6	837.5±23.7	803.7±25.1
Yorkshire	942.7±18.4	809.6±19.8	902.8±24.4	903.5±19.3

¹ Spring (March–May), summer (June–August), autumn (September–November) and winter (December–February).

² Means±SE for six ejaculates from each of four Duroc and Yorkshire boars.

마. 종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 estradiol-17 β 의 농도 비교

종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 estradiol-17 β 의 농도를 비교한 결과 (Table 5)는 요크셔종과 듀록종 간에 차이가 없었다. 또한 두 품종 모두에서 계절 간에도 차이가 없었다. 또한 두 품종 모두에서 계절 간에도 차이가 없었다.

이상의 결과는 성장중인 숫돼지에서 혈장 estradiol-17 β 의 농도를 조사한 결과 40일령에 11.3pg/ml, 250일령에 114.2pg/ml을 나타내어 성장하면서 농도가 증가한다는 Allrich 등(1981)의 보고와는 차이가 있었다. 본시험에서는 360~450 일령의 숫돼지가 이용되었으며, 이 시기에서는 품종과 계절간에 혈청중 estradiol-17 β 의 농도에서 차이가 없었다.

Table 5. Comparison of serum estradiol-17 β concentrations between breeds and among seasons in boars

Breed	Serum estradiol-17 β concentrations (pg/ml) ^{1, 2}			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Duroc	31.6±2.7	30.8±2.5	29.5±2.9	30.4±2.1
Yorkshire	34.5±2.0	33.4±2.2	33.0±2.4	31.8±2.6

¹ Spring (March–May), summer (June–August), autumn (September–November) and winter (December–February).

² Means±SE for six ejaculates from each of four Duroc and Yorkshire boars.

바. 종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 testosterone 농도 비교

종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 testosterone의 농도를 비교한 결과는 Table 6에 나타난 바와 같이 요크셔종이 듀록종 보다 모든 계절에서 높게 나타났다.

Table 6. Comparison of serum testosterone concentrations between breeds and among seasons in boars

Breed	Serum testosterone concentrations (ng/ml) ^{1, 2}			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Duroc	3.75±0.49 ^{ax}	1.21±0.08 ^{ay}	1.84±0.17 ^{ay}	1.95±0.44 ^{ay}
Yorkshire	5.96±0.43 ^{bx}	2.84±0.37 ^{by}	3.01±0.36 ^{by}	3.25±0.32 ^{by}

¹ Spring (March–May), summer (June–August), autumn (September– November) and winter (December–February).

² Means±SE for six ejaculates from each of four Duroc and Yorkshire boars.
ab Means±SE in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

xy Means±SE in the same row with different letters differ significantly (P<0.05).

또한 두 품종 모두에서 각각 봄철이 여름, 가을 및 겨울철에 비하여 혈청 중 testosterone의 농도가 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과는 정액량이 많고, FSH 농도가 낮은 요크셔종이 듀록종 보다 testosterone의 농도가 높았다. 이 결과는 앞으로 우수 종모돈 선발의 좋은 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

4. 결 론

본 연구는 종모돈의 정액성상, 동결-융해 후 정자의 생존성 그리고 혈청중 FSH, LH, estradiol-17 β 및 testosterone 농도에 미치는 품종과 계절의 영향을 조사하여 우수한 종모돈의 선발을 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

요크셔종이 듀록종 보다 봄, 여름, 가을, 겨울에서 정액량이 많았으며, 정액농도에서는 차이가 없었다. 계절별 정액량은 듀록 및 요크셔종에서 봄철이 여름, 가을 및 겨울철에 비하여 많았고, 정자농도는 차이가 없었다. 듀록종과 요크셔종에서 각각 봄철에 생산한 정자가 여름, 가을 및 겨울철에 생산한 정자 보다 동결-융해 후 정자운동성 및 정상침체 비율이 높았다. 한편 듀록종과 요크셔종에서 동결-융해 후 정자운동성은 모든 계절에서 요크셔종이 높게 나타 났으나, 정상침체에서는 차이가 없었다.

혈청 중 FSH의 농도를 비교한 결과 요크셔종이 듀록종 보다 모든 계절에서 낮은 농도를 나타내었다. 그러나 두 품종 모두에서 각각 계절 간에 차이가 없었다. 혈청 중 LH와 estradiol-17 β 의 농도를 비교한 결과 요크셔종과 듀록종 간에 차이가 없었다. 또한 두 품종 모두에서 계절 간에 차이가 없었다. 종모돈의 품종별, 계절별 혈청 중 testosterone의 농도를 비교한 결과 요크셔종이 듀록종 보다 모든 계절에서 높게 나타났다. 또한 두 품종 모두에서 각각 봄철이 여름, 가을 및 겨울철에 비하여 혈청 중 testosterone의 농도가 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 보면, FSH의 농도가 낮을수록 정액생산량이 높은 것으로 나타났으며, 혈청 중 testosterone의 농도가 높을수록 동결-융해 정자의 운동성 및 정상침체의 비율이 높은 것으로 나타났다.

제 9 절 원정액과 동결정액에서 유세포분류기를 이용한 정자세포의 세포막 완전성과 미토콘드리아 활성의 분석

1. 서 론

유세포분류기(flow cytometers)는 정자형태를 분석하고 (Pinkel 등, 1979), 정자세포 생존성을 평가하기 위하여(Matyus 등, 1984 ; Garner 등 , 1986, 1988) 사용되어지고 있다. 유세포 분류기를 이용한 정자세포 생존성과 미토콘드리아의 활성을 동시에 분석할 수 있는 방법이 보고되었고, 정자운동성과 미토콘드리아의 형광강도 사이에는 상관관계가 있다는 것이 보고되었다(Evenson 등, 1982 ; Auger 등, 1989). Rhodamine 123(Rh123)는 유세포분류기를 이용해서 정자운동성과 미토콘드리아 전위(mitochondrial potential)을 비교하고 동시에 미토콘드리아의 활성을 평가하기 위해서 사용되어왔다(Evenson 등, 1982). 최근 승어의 원정액과 동결정액을 이용하여 유세포분류기에서 Rh123는 미토콘드리아의 양적인 평가를, propidium iodide(PI)는 정자세포막의 완전성을 평가하는데 사용하였다(Ogier de Baulny 등, 1997).

앞으로 번식학의 기초 및 응용연구에서 유세포분류기의 응용은 정자의 형태와 운동성을 구명할 수 있으므로 정자의 정상기능과 이상기능을 예견할 수 있게 될 것이다. 미토콘드리아의 활성과 정자세포막의 완전성에 대한 분석은 원정액의 정자나 동결-융해정자의 기능을 결정하기 위해서 사용될 수는 없을 지라도 실험실내에서 정자의 예비적 검사를 위해서 유용하게 사용할 수 있다.

본 연구의 목적은 원정액 및 동결-융해정액의 정자에서 세척배지, 품종 그리고 세척온도가 미토콘드리아의 활성과 세포막의 완전성에 어떤 영향을 미치는가를 유세포분류기를 이용하여 평가하는 것이었다.

2. 재료 및 방법

가. 정액 채취

종모돈은 15~22개월령의 것을 사용했으며 2004년 8월부터 2005년 7월까지 충남대학교 동물사육장의 양돈장에서 사육하였다. 정액은 듀록, 랜드레이스, 라지화이트 각 6두로부터 일주일에 1회씩 채취하였다.

나. 정액량, 정자농도, 운동성 및 침체의 조사

정액량은 눈금이 새겨진 시린더를 사용하여, 정자농도는 헤모사이토미터를 이용하여 조사하였다. 정자의 운동성은 37°C로 가온한 광현미경하에서 250배의 배율로 조사하였으며 (Pursel과 Park, 1985), 침체의 형태는 위상차현미경하에서 1000배의 배율로 한 샘플당 정자 100개를 조사하여 평가하였다. 침체형태는 네 종류로 분류하였다.

즉 정상침체(NAR), 손상된 침체(DAR), 결실된 침체(MAR), 이완된 침체(LAC)로 나누어 평가하였다(Pursel 등, 1972). 본 시험에는 80%이상의 운동성과 정상침체를 가지는 농후정자부분을 사용하였다.

다. 동결정액제조

보온병에 채취한 정자농후부분(30~60ml)은 실온(20~23°C)에서 2시간 동안 서서히 냉각시켰다. 15ml 튜브에 농후정자부분의 정액을 취하고 800g로 10분간 원심분리하여 정장을 제거하였다. 정장을 제거한 정자는 최종 정자농도가 1.0×10^9 /ml 되도록 LEN(lactose, egg yolk, N-acetyl-D-glucosamine) 1차 희석액(Yi 등, 2002)으로 5ml 되도록하여 재부유시켰다. 1차 희석정액은 5°C 냉장실에서 2시간 보존후 LEN +4% 그리세롤 희석액(2차 희석액) 5ml 로 2차 희석하여 총 정액량이 10ml 되도록 하였다. 상기와 같이 희석된 정액은 즉시 스트로(Minitub GmbH, Landshut, Germany)에 5ml 씩 나누어 주입하여 금속볼(steel ball)로 봉인하였다. 주입 및 봉인된 스트로는 공기층을 가운데로 오게 한 후 aluminum rack 위에 수평으로 놓은 후 액체질소 표면에서 5cm 떨어진 곳에 수평으로 놓아 20분간 동결시킨 후 -196°C의 액체질소통에 보관하였다. 액체질소통에 보관된 스트로는 실온에 놓여진 52°C 수로에서 45초 동안 융해하여 스트로 내부의 온도가 융해즉시 15°C가 되도록 하였다.

라. Rh123 과 PI 염색

정자 최종농도가 5×10^6 sperm/ml 되도록 원정액과 동결정액을 10~20ml 취하여 사용하였다. 정자 샘플을 400ml의 mTLP-PVA(Yoshida 등, 1992)와 BTS(Pursel 과 Johnson, 1975) 배지로 20°C와 4°C에서 각각 1500rpm으로 3분 세척한 후, Rh123(Sigma, St. Louis, MD, USA) 5mg/ml에서 20분간 배양했다. 20분 배양 후 샘플은 400ml의 mTLP-PVA와 BTS 배지로 20°C와 4°C에서 각각 1500rpm으로

3분간씩 2번 세척하였다. 그리고나서 샘플은 PI(Sigma, St. Louis, MD, USA) 5mg/ml에서 10분간 배양 후 분석하였다.

마. 유세포분류기를 이용한 분석

정자샘플 분석은 100mW power를 가지고 488nm로 작동하는 argon laser가 부착된 FACStar Plus Analyzer(Becton-Dickinson, CA, USA)를 사용해서 sheath fluid 내에서 1초당 1000 events 의 율(rate)로 수행하였다. Rh123 형광은 530nm band pass filter를 통해서 측정되었고, 두 형광의 방출은 560nm dichroic mirror에 의해서 분리되었다. 각각 샘플에 대하여 10,000 events 가 두 형광을 위해서 분석되어졌고, 5,000 events가 PI 집단을 위해서 분석되어졌다. 정자세포의 퍼센트와 형광의 평균값은 bi-parametric analysis(Rh123 vs. PI fluorescence)와 PI 집단을 위한 mono-parametric analysis를 위해서 만들어진 Windows에 의해서 계산되었다.

바. 통계분석

완전임의배치에 의한 분산분석(ANOVA)이 SAS package(SAS, 1996)에 의해서 수행되었다. F값이 유의성($P < 0.05$)이 인정되었을 때 개체처리 간 평균값을 비교하기 위하여 student's t-test가 사용되었다.

3. 결과 및 고찰

Fig.1에 나타난 바와같이 PI staining에 의해서 식별되어진 빈사상태이거나 죽은 정자의 비율은 region 1에 극소화되어지고 계량화되어졌다. 그러나 기능성 세포막과 미토콘드리아를 가지고 있는 정자의 비율은 PI staining이 아닌 Rh123 staining에 의해서 식별되어진 region 3에 극소화되어지고 계량화되어졌다. 완전한 세포막을 가지고 있으나 미토콘드리아 활동성이 없는 정자는 region 2에서 측정되었다. 매우 드물게 몇몇 정자들이 region 4에서 발견되었으나 본 실험에서는 고려하지 않았다. mTLP-PVA 배지로 20°C에서 세척한 원정액은 80%이상이 완전한 세포막과 기능성 미토콘드리아를 가지고 있었다. 동결-융해 정자는 region 1, 2 및 3에 분포되어졌고, 많은 수의 정자가 손상된 세포막과 비기능성 미토콘드리아를 가지고 있었다.

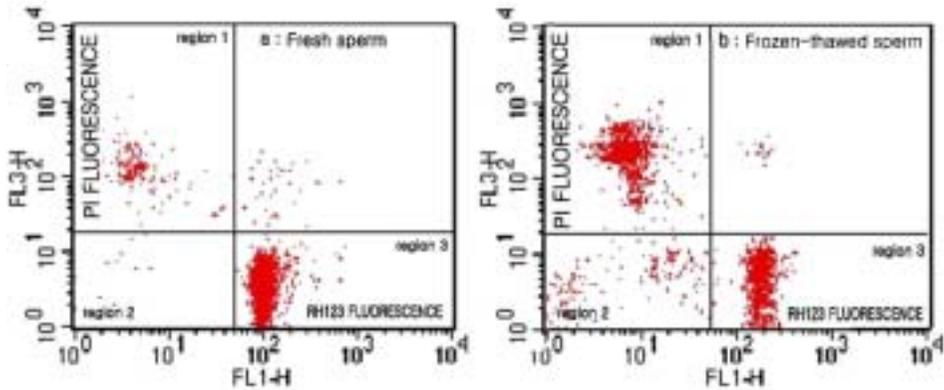


Fig. 1. Flow cytometric dot plots of boar sperm analyzed for rhodamine 123 and propidium iodide fluorescence. Fresh and frozen-thawed sperm washed with mTLP-PVA medium at 20°C are presented in the (a) and (b), respectively.

세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활동성에 미치는 원정액과 동결-융해된 정자의 세척배지의 효과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 원정액과 동결-융해된 정액의 정자에서 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활동성은 mTLP-PVA 배지가 BTS 배지보다 높았다. 그러나 Table 2에 나타난 바와같이 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활동성은 원정액과 동결-융해된 정액의 정자에서 품종간에는 차이가 없었다.

Table 1. Effects of washing medium of fresh and frozen-thawed sperm on mitochondrial activity and membrane integrity

Washing medium ¹	Fresh sperm ²		Frozen-thawed sperm ²	
	Rh 123 (%) ³	PI (%) ³	Rh 123 (%) ³	PI (%) ³
mTLP-PVA	81.6±1.8 ^b	14.8±1.8 ^a	44.9±2.6 ^b	36.4±1.8 ^a
BTS	73.1±2.2 ^a	21.9±2.1 ^b	28.9±1.8 ^a	46.9±2.1 ^b

¹ Washing of fresh and frozen-thawed sperm was done at 20°C

² Means ±S.E. for six ejaculates from each of six Duroc, Landrace and Yorkshire boars.

³ Rhodamine 123 (Rh 123) and propidium iodide (PI) are percentages of mitochondrial activity and damaged membrane, respectively.

^{a, b} Means ±S.E. in the same column with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2. Effects of breed of fresh and frozen-thawed sperm on mitochondrial activity and membrane integrity¹

Breed	Fresh sperm ²		Frozen-thawed sperm ²	
	Rh 123 (%) ³	PI (%) ³	Rh 123 (%) ³	PI (%) ³
Duroc	85.8±3.4	11.0±2.7	45.1±2.5	38.7±2.7
Landrace	78.2±3.3	17.9±3.9	48.3±3.6	32.3±2.4
Yorkshire	80.8±2.5	15.5±2.1	41.4±6.7	38.2±3.7

¹ Washing of fresh and frozen-thawed sperm was done at 20°C

² Means ±S.E. for six ejaculates from each of six Duroc, Landrace and Yorkshire boars.

³ Rhodamine 123 (Rh 123) and propidium iodide (PI) are percentages of mitochondrial activity and damaged membrane, respectively.

Table 3. Effects of washing temperature of fresh and frozen-thawed sperm on mitochondrial activity and membrane integrity¹

Washing temperature	Fresh sperm ²		Frozen-thawed sperm ²	
	Rh 123 (%) ³	PI (%) ³	Rh 123 (%) ³	PI (%) ³
20°C	81.6±1.8	14.8±1.8 ^a	44.9±2. ⁶	36.4±1.8 ^a
4°C	—	68.9±3.4 ^b	—	77.8±3.7 ^b

¹ Washing of fresh and frozen-thawed sperm was done by mTLP-PVA medium.

² Means ±S.E. for six ejaculates from each of six Duroc, Landrace and Yorkshire boars.

³ Rhodamine 123 (Rh 123) and propidium iodide (PI) are percentages of mitochondrial activity and damaged membrane, respectively.

^{a, b} Means ± S.E. in the same column with different letters differ significantly (p<0.05).

Table 3에 나타난 바와같이 원정액과 동결-융해된 정액의 정자에서 손상된 세포막의 비율은 4°C 세척온도가 20°C 세척온도보다 높았다. 그러나 유세포분류기를 이용한 미토콘드리아의 활동성 분석은 4°C 세척온도에서 가능하지 않았다. 돼지에서 동결정액의 정자는 원정액의 정자보다 운동성, 정상침체형태 그리고 생존성이 나쁘다(Clarke와 Johnson, 1987 ; Almlid와 Johnson, 1998 ; Hofmo와 Almlid, 1991). 따라서 분만율(40~50%)도 낮고 산자수도 적기 때문에 동결정액이 상업적으로 이용되지 않는다(Johnson, 1985, Crabo와 Dial, 1992). 한편 동결정액은 체내 또는 체외에서 성숙된 돼지 난모세포의 체외수정을 위해서 사용되고 있

으나, 그 결과들은 채취된 정액이나 실험실간에 차이가 많아 일정하지 않다. Yi 등(2004)에 의하면 체외성숙후 체외수정된 난모세포의 배반포까지의 비율은 정자를 mTLP-PVA로 세척한 것이 세척하지 않은 정자, BTS나 mTBM으로 세척한 정자보다 높았다고 보고하였다. Kramer 등(1993)은 유세포분류기를 이용하여 액상 및 동결된 정자를 Rh123로 염색하여 미토콘드리아의 기능을 계량화하였고, PI로 염색하여 정자세포막의 완전성을 평가하였다.

정자를 0~10℃ 또는 15℃까지 급속냉동시 손상이 심하다는 것은 잘 알려진 사실이다(Morris와 Watson, 1984). 돼지의 원정액을 분리채취하지 않고 전체를 함께 채취했을 경우 15℃ 이하로 냉각시키면 정자는 생존할 수 없다. 그러나 채취후 일정시간 배양을 하면 저온충격에 대한 저항성을 얻을 수 있다.

저온충격에 의해서 가장 쉽게 손상되어지는 세포소기관은 세포막, 침체 그리고 미토콘드리아이다. 세포막은 점진적으로 누출되고 손상을 입게되며, 그 다음으로는 침체의 막과 내용물이 손상을 입게 된다(Watson과 Plummer, 1985).

결론적으로 유세포분류기를 이용한 원정액과 동결-융해정자의 세포막 완전성과 미토콘드리아의 활성을 분석하기 위해서는 20℃에서 mTLP-PVA 배지가 적합하다는 것을 구명하였다.

4. 결 론

본 연구는 유세포분류기를 이용하여 원정액과 동결-융해정액의 정자에서 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활성에 미치는 세척배지, 품종 그리고 세척온도의 효과를 평가하기 위하여 실시하였다. 20℃에서 mTLP-PVA 배지로 세척한 원정액의 정자는 80%이상이 완전한 세포막과 기능성 미토콘드리아였다. 동결-융해정자에서는 20℃에서 mTLP-PVA 배지와 BTS 배지로 세척한 경우 많은 수의 정자가 손상된 세포막(36.4~46.9%)과 비기능성 미토콘드리아(55.1~71.1%)였다. 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활성은 원정액이나 동결-융해정액의 정자에서 모두 품종의 효과가 없었다. mTLP-PVA 배지에서 4℃의 세척온도가 20℃의 세척온도 보다 손상된 세포막의 비율이 높았다.

결론적으로 유세포분류기를 이용한 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활성을 분석하기 위해서는 원정액이나 동결정액에서 모두 세척배지와 세척온도가 중요한 요인이었다.

제 10 절 원정액과 동결정액의 Confocal Imaging 기술을 이용한 정자내 Ca 이온 조절기전 구명

1. 서 론

돼지 정자에서 저온 충격은 정자내에 Na와 Zn이온을 증가시키고 K이온을 감소시킨다고 하였다(Hood 등, 1970). Mg이온은 희석액이 희석된 정자에서 급격히 감소하나 희석되지 않은 원정액에서는 감소하지 않는다고 보고하였다(Quinn과 White, 1966). Ca이온의 축적은 종모돈 간에 차이가 많이 나타나며, 저온 충격후 Ca이온의 세포내 위치도 동일하지 않다고 하였다(Watson과 Plummer, 1985). 특히 침체반응시에는 정자 내부 Ca농도가 증가한다고 알려져있다. Ca이온의 증가는 침체반응을 유도하는 주된 초기 신호자극으로 작용한다. 침체반응은 두 단계로 이루어지는데 그 첫째 단계는 PIP_2 - 특이적 PLC 활성이 초기 3분정도 증가되는 것과 관계되고, 바로 몇분후에 잇달아 막 융합이 일어난다(Roldan 과 Harison, 1989 ; Thomas 와 Meizel, 1989). 이 두 단계의 구분은 Ca 농도의 변화가 시간에 따라 두 단계로 일어나서 발생할 가능성이 있고, 두 단계 Ca 농도 변화를 야기하는 기전은 그 동력학적 특성과 세포위치상으로 각각 다를 것으로 제안되고 있다(Sihra 등, 1992).

따라서 본 연구는 돼지의 원정액과 동결정액을 Confocal Imaging 기술을 이용하여 정자내 Ca이온 조절기전을 구명함으로써 앞으로 체외수정시 다정자침입기술을 방지할 수 있는 기초자료를 얻고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. Sperm Capacitation

신선하게 사출된 돼지(Duroc) 정액은 수정능 획득 전 37 °C 항온기에 계속 보관하였다. 돼지 정자의 농도는 평균 4×10^8 개/ml 이었다. 보관된 정상 돼지 정자의 수정능 획득을 위하여, 정자를 capacitation 용액 (5 mg/ml BSA [bovine serum albumin, Sigma] + Tyrode 용액 [135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 15 mM $NaHCO_3$, pH 7.40])에서 1 시간 동안 incubation(37 °C)하였다.

동결된 돼지 정액은 해동한 후에 수정능 획득을 실시하였다. 동결 돼지 정자의 농도는 평균 4×10^8 개/ml이었다. 액체 질소에 보관되어 있던 동결 돼지

정자를 52 °C 항온 수조에서 42 초간 해동시킨 후, IL-PVA 용액(114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 0.27 mM glucose, 10 mM sodium lactate, 2 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.03 mM Phenol red, 0.25 mM sodium pyruvate, 0.3% BSA, 100 IU/ml penicillin, 25 µg/ml gentamycin, 2 mg/ml polyvinylalcohol, pH 7.40)으로 옮긴 후, 1,500 rpm으로 원심 분리를 하여, 상층액을 버리고 정자 층만을 다시 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 세척 후 37 °C로 가온된 Tyrode 용액에 재부유한 후, 동일한 capacitation 과정(윗 문단 참조)을 반복하였다.

나. Confocal Ca²⁺ imaging 및 분석

수정능 획득 후 정세포 내에 Ca²⁺ 형광 지시약인 fluo-4 AM (5 µM; Molecular Probes Inc.)으로 1 시간 동안 실온에서 loading 하였고, 동시에 세포를 실험용 커버글라스에 안착시켰다. 그 후 단일 정세포 내 세포질 Ca²⁺ 농도 변화를 공초점 현미경(inverted LEICA DM IRBE)으로 영상화(imaging)하였다. 자체 제작한 관류 장치를 사용하여 37 °C로 가온된 Tyrode 용액을 정세포 외부에 계속 superfusion 하였다. Ca²⁺ image의 기록과 분석은 Workstation TCS NT 프로그램을 사용하여 시행하였다. 각 약물의 처리는 자체 제작한 고속 용액교환 장치를 이용하여 단일 세포를 대상으로 시행하였다.

측정된 fluo-4-Ca²⁺ 형광의 비(F/F₀)로 Ca²⁺ 농도를 나타내었으며, Ca²⁺ 농도의 변화는 정세포의 head(두부)에서 측정하였다. F₀는 평균 휴지기 형광광도(average resting fluorescence intensity)를, F는 형광광도를 각각 나타낸다.

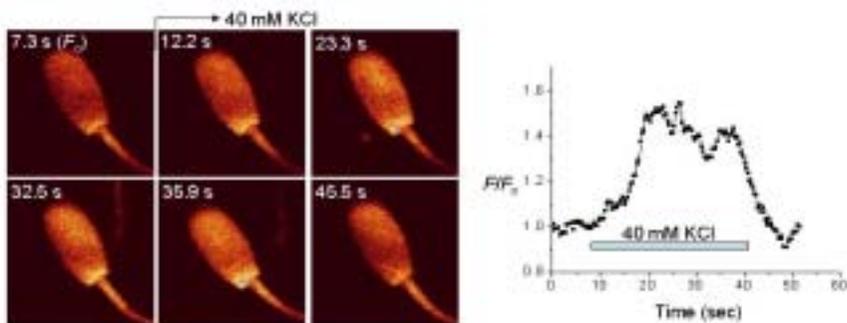


Fig. 1. Effect of high KCl on intracellular Ca concentration in fresh pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of KCl on intracellular Ca (F/F₀). F/F₀ was measured from head region.

3. 결과 및 고찰

가. 정상 및 동결 정자에서 탈분극 유도성 세포내 칼슘 이온 농도($[Ca^{2+}]_i$) 조절의 비교 고찰

성공적으로 수정이 일어날 때에는 정세포 막의 전압이 탈분극 된다고 잘 알려져 있다. 탈분극시 세포막의 전압의존성 칼슘 채널이 열리고 외부의 Ca^{2+} 이 내부로 유입되어 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가를 유도한다. 동결 후 정자에서 이러한 조절기전이 동결하지 않은 정상 정자와 유사하게 나타나는지를 알아보기로 본 실험을 수행하였다.

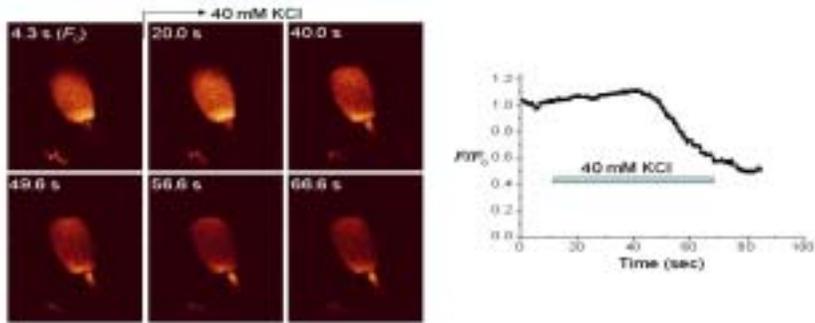


Fig. 2. Effect of external high K on intracellular Ca concentration in frozen pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of KCl on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

① 세포막 전압의 탈분극은 세포 외부용액에 고농도의 K^+ (40 mM)을 첨가하여 단일 정자에 처리함으로써 유도하였다. 정상 정자의 경우 K^+ 처리 후 Ca^{2+} 농도가 두 단계의 증가기를 보이며 현저히 증가하였다. $[Ca^{2+}]_i(F/F_0)$ 는 K^+ 에 의하여 12.8초 후에 최대값에 도달하였고, 형광 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.52이었다. 첫 번째 Ca^{2+} 증가 단계는 K^+ 를 처리한 후 6.4초 동안의 형광 변화량 ($\Delta F/F_0$)이 다소 적었으나(0.11), 두 번째 단계에서는 6.4초(처리 후 12.8 초) 동안 보다 급격한 농도 변화($\Delta F/F_0 = 0.41$)를 보였다.

동결한 정자에 똑같이 고농도(40 mM)의 K^+ 을 세포 외부에 빠르게 처리하면, 흥미롭게도 세포내 Ca^{2+} 의 증가폭이 현저히 낮다. K^+ 처리 후 35.3초에 Ca^{2+} 농도 수치가 최대에 도달하여 그 증가속도도 낮음을 알 수 있었고, 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.1이었다. 최대값에 도달한 후, Ca^{2+} 농도는 다시 지속적으로 감소하여 K^+ 처리 전 농도보다 오히려 현저히 낮아졌다.

나. 정상 및 동결 정자에서 소포체 Ca^{2+} pump 억제에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 조절 비교

수정이 일어날 때 정세포 막의 탈분극 시 세포막을 통한 Ca^{2+} 의 유입에 의해 세포내 Ca^{2+} 의 저장고 즉 소포체로부터 Ca^{2+} 이 유리된다. 위의 실험에서 탈분극시 동결한 정자는 현저히 칼슘 증가가 저하되었음을 관찰하였는데 그 이유를 알아보려고, 먼저 소포체 내 Ca^{2+} 의 저장량을 비교하였다. 소포체의 세포막에 존재하는 Ca^{2+} pump는 평소 세포질 Ca^{2+} 을 uptake하여 적당량의 Ca^{2+} 이 소포체에 저장되도록 한다. Thapsigargin을 처리하여 이 단백질을 선택적으로 억제하면, 소포체의 Ca^{2+} 이 세포질로 결국 빠져 나오며, 이 때 세포질에 증가한 Ca^{2+} 의 양을 측정하여 간접적으로 소포체의 Ca^{2+} 양을 알아낼 수 있다.

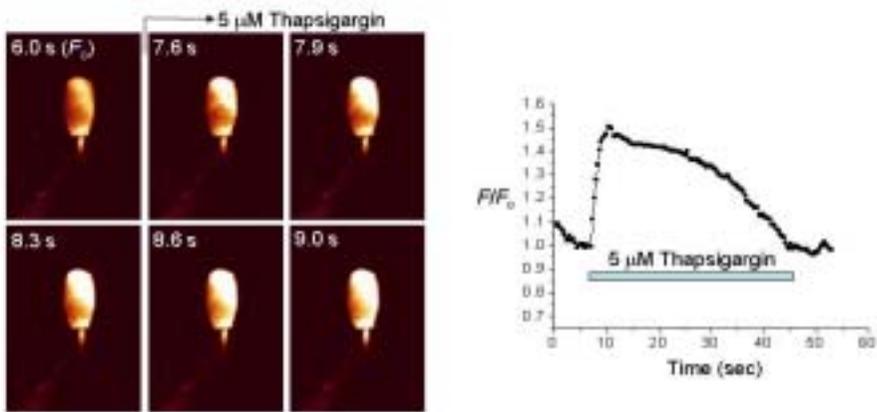


Fig. 3. Effect of thapsigargin on intracellular Ca concentration in fresh pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of thapsigargin on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

② 5 μM thapsigargin을 처리하였을 때, 정상 정세포 내의 Ca^{2+} 농도는 처리 후 3.2초 후에 최대값에 도달하였고, 그 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.51이었다. 이 최대값은 소포체 내 Ca^{2+} 저장량을 나타낸다.

증가현상은 일시적으로 나타났고 즉시 다시 감소하였는데, 이는 세포막에 존재하는 다른 Ca^{2+} 수송체가 증가한 세포질 Ca^{2+} 을 세포 외부로 내보내기 때문일 것으로 생각된다. 동결한 정자에서는 이와 대조적으로 동일 농도의 thapsigargin을 처리하였을 때 세포질 Ca^{2+} 농도의 변화량(F/F_0)이 현저히 낮았다. 특히 Ca^{2+} pump의 억제 후 증가한 세포질 Ca^{2+} 은 증가-감소의 주기적인 현상(oscillation)을 나타내었다. 이 결과는 동결정자의 소포체 Ca^{2+} 저장량이 정상 정자에 비해 현저히 낮음을 나타내는 증거이다.

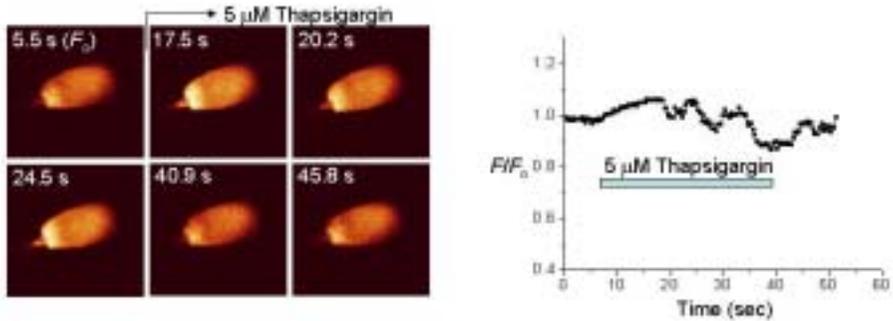


Fig. 4. Effect of thapsigargin on intracellular Ca concentration in frozen pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of thapsigargin on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

다. 정상 및 동결 정자에서 caffeine-민감성 소포체의 Ca^{2+} 저장량 비교

Thapsigargin에 의해 세포질에 증가하는 Ca^{2+} 양이 소포체의 Ca^{2+} 저장량을 나타내나, 세포내에는 Thapsigargin-insensitive Ca^{2+} 저장고가 독립적으로 존재할 가능성을 배재할 수 없다. 이 저장고는 ryanodine 수용체를 포함하는 또 다른 저장고일 가능성이 있는데, 이를 조사하기 위하여 ryanodine 수용체를 선택적으로 활성화시키는 caffeine을 고농도로 사용하여 이 소포체의 Ca^{2+} 저장량을 조사 비교 하였다.

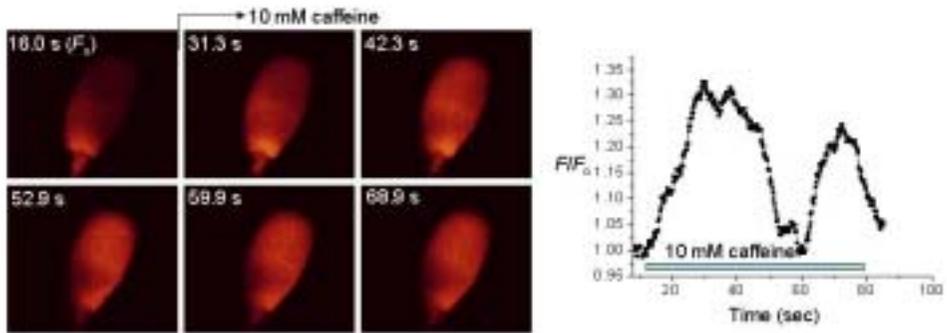


Fig. 5. Effect of caffeine on intracellular Ca concentration in fresh pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of caffeine on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

③ 정상 정세포내의 Ca^{2+} 농도는 caffeine 처리 후 현저한 증가를 보였다. 정자 두부 내의 Ca^{2+} 농도는 처리 후 18.1초 후에 최대값에 도달하였고, 그

변화량($\Delta F/F_0$)은 0.33이었다. 증가한 Ca^{2+} 에 의한 regenerative Ca^{2+} release가 종종 일어남을 관찰할 수 있었다(delay 후 다시 Ca^{2+} 의 증가가 관찰됨).

동결 정자에 10 mM caffeine을 처리하였을 경우, 정세포 내 Ca^{2+} 농도 증가는 거의 관찰되지 않았다. 오히려 Caffeine 처리 후(5.5초) Ca^{2+} 농도가 휴지기 양보다 다소 감소하였다. 본 실험 결과는 동결 후에 정세포 내에 존재하는 caffeine-민감성 소포체 내의 Ca^{2+} 저장량이 현저히 낮음을 보여주고 있다.

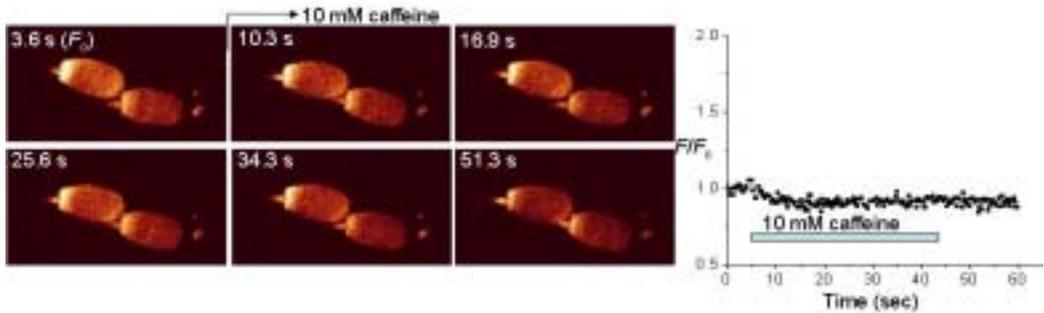


Fig. 6. Effect of caffeine on intracellular Ca concentration in frozen pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of caffeine on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

라. 정상 및 동결 정자에서 progesterone에 의한 Ca^{2+} 조절 효과

수정이 일어나기 전에 난포액에서 유리되는 호르몬의 주된 성분인 progesterone에 의한 정세포의 반응이 acrosome reaction에 중요하다고 여겨지고 있다. 특히 이때 progesterone에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 중요할 것으로 생각되고 있다. 정상 정자와 동결한 정자에 대한 progesterone의 효과를 비교 고찰하였다.

④ 정상 정자에 100 μ M progesterone을 처리하였을 때, 정자 두부 내의 Ca^{2+} 농도는 처리 후 24.2초 후에 최대값에 도달하였고, 그 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.87이었다. 최대값에 도달한 후 Ca^{2+} 농도는, progesterone이 계속 존재하는 상태에서 23.5초간 완만한 감소를 나타내었다. Progesterone의 처리를 중단한 후부터 급격한 감소를 나타내었다. 두부 내의 Ca^{2+} 농도는 progesterone에 의해 두 단계로 증가되었다.

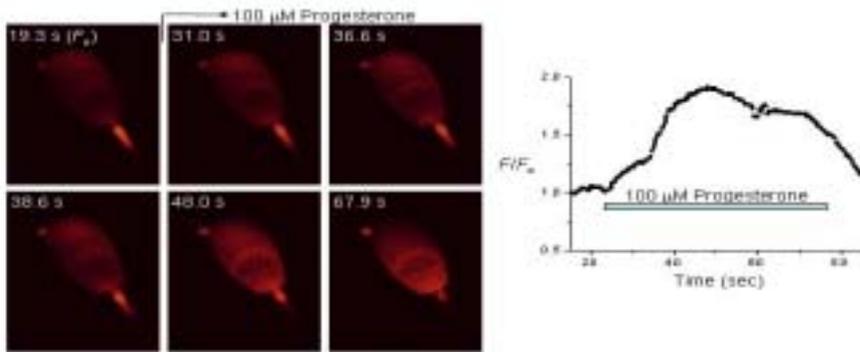


Fig. 7. Effect of progesterone on intracellular Ca concentration in fresh pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of progesterone on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

즉, progesterone 처리 후, 첫 번째 단계로, 8.6초 후까지 완만한 증가를 나타내었고, 형광 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.24이었다. 두 번째 단계의 progesterone에 의한 Ca^{2+} 농도의 변화는 더욱 급격하였는데, 15.6초 동안의 형광 변화량($\Delta F/F_0$)이 0.63이었다. 감소 또한 두 단계로 나타났다. 첫 단계는 약 12.6초 동안 $\Delta F/F_0$ 가 약 0.18 감소하였고, 두 번째 단계에서는 10.9초 동안 $\Delta F/F_0$ 가 0.03 감소하였다.

동결하였던 정자에 progesterone을 처리하였을 경우, Ca^{2+} 농도는 증가하지 않았고, 처리 후 지속적으로 감소하여, 12.2초 내에 최소값에 도달하였다. 감소한 $\Delta F/F_0$ 은 값은 0.20이었다. 본 실험 결과는 정자의 동결 후 progesterone에 대한 세포 반응 기작이 손상됨을 나타낸다.

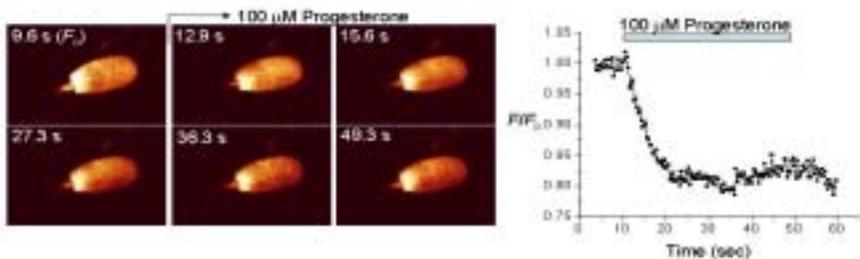


Fig. 8. Effect of progesterone on intracellular Ca concentration in frozen pig spermatozoa. Left panel shows confocal Ca images recorded at indicated time points. Right panel shows time course of the effect of progesterone on intracellular Ca (F/F_0). F/F_0 was measured from head region.

마. 각 실험의 통계적 요약

Fig. 9는 위에서 열거한 4종류의 실험에 대하여 여러 개의 정세포에서 얻은 결과를 요약하여 비교한 그래프이다.

※ 40 mM K⁺을 처리한 경우, 정상 정자의 F/F₀는 1.37 ± 0.07 (n = 48)이었고, 동결한 정자의 F/F₀는 1.13 ± 0.03 (n = 10)이었다. 5 μM thapsigargin을 처리한 경우, 정상 정자의 F/F₀는 1.42 ± 0.08 (n = 22)이었고, 동결 정자의 F/F₀는 1.09 ± 0.04 (n = 6)이었다.

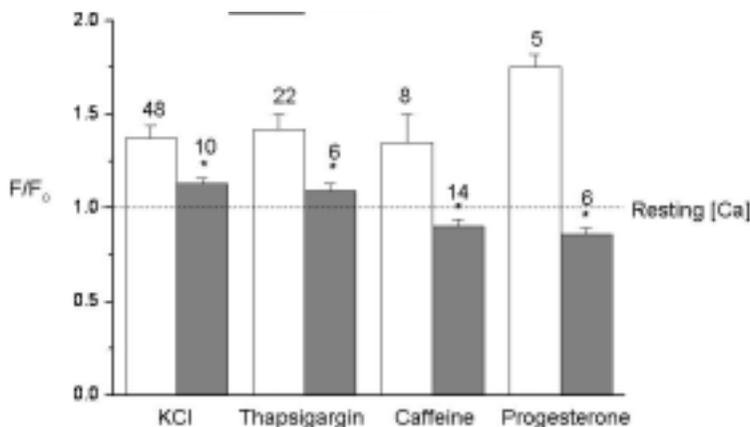


Fig. 9. Comparisons of the effects of 40 mM K⁺(KCl), 5 μM thapsigargin, 10 mM caffeine, 100 μM progesterone on intracellular Ca concentrations in fresh and frozen spermatozoa. Numbers indicate number of cells tested. **P* < 0.01 vs. fresh cells.

10 mM caffeine을 처리한 경우, 정상 돼지 정자의 F/F₀는 1.35 ± 0.15 (n = 8)이었고, 동결 정자의 F/F₀는 0.90 ± 0.04 (n = 14)이었다. 100 μM progesterone을 처리한 경우, 정상 돼지 정자의 F/F₀는 1.75 ± 0.07 (n = 5)이었고, 동결 정자의 F/F₀는 0.86 ± 0.03 (n = 6)이었다. 4가지 실험 결과에 대해 모두 정상 정자와 동결 정자 Ca²⁺농도의 F/F₀가 모두 유의적으로(**P* < 0.01) 현저한 차이가 있음을 구명하였다.

4. 결 론

본 실험은 돼지의 원정액과 동결정액을 confocal imaging 기술을 이용하여 칼슘이온의 signaling을 비교하고자 실시하였다. 40 mM K^+ 을 처리한 경우, 정상 정자의 F/F_0 는 1.37 ± 0.07 ($n = 48$)이었고, 동결한 정자의 F/F_0 는 1.13 ± 0.03 ($n = 10$)이었다. 5mM thapsigargin을 처리한 경우 정상정자의 F/F_0 는 1.42 ± 0.08 ($n = 22$)이었고, 동결정자의 F/F_0 는 1.09 ± 0.04 ($n = 6$)이었다.

10 mM caffeine을 처리한 경우, 정상 돼지 정자의 F/F_0 는 1.35 ± 0.15 ($n = 8$)이었고, 동결 정자의 F/F_0 는 0.90 ± 0.04 ($n = 14$)이었다. 난포액의 주요 성분중의 하나인 Progesterone 100mM를 처리한 경우 원정액의 정자에서는 Ca 이온이 급격하게 증가했으나, 동결정액에서는 Ca 이온 농도가 감소하였다.

제 11 절 원정액과 동결-융해정액의 정자내 ATP함량과 내동성 정자의 수정능력

1. 서 론

돼지 정자의 질(quality)과 생존성(viability)을 체외에서 평가하는 많은 방법들이 보고 되어왔다. 그러나 아직까지도 정자의 운동성에 의존하여 정자의 질과 생존성을 평가하고 있다. 침체형태, 세포외부의 효소농도, 온도저항성, 생사염색, 삼투압 농도 그리고 세포막 성분누출 등이 부분적인 평가 방법으로 사용되고 있다.

본 연구는 정자내 ATP 농도를 평가하기 위한 bioluminescence 방법을 개발하여 원정액과 동결정액의 정자내 ATP 농도를 평가함으로써 ATP 농도와 수정능력과의 관계를 구명하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 정액채취

정액은 2004년 8월부터 2005년 7월까지 충남대학교 부속동물사육장에서 사육되고 있는 15-22개월령 종모돈으로부터 채취하였다. 공시돈은 Yorkshire 종모돈 6두와 Landrace 종모돈 7두로부터 1주일에 한 번씩 정액을 채취하였다.

나. 정액성상 조사

채취된 원정액 (raw semen)의 양을 메스실린더로 측정하고, 혈구계산판을 이용하여 정자농도를 계산하였다. 정자운동성을 조사하기 위하여 37 °C 가온판이 장착된 위상차현미경 250배하에서 관찰하였다 (Pursel and Park, 1985). 정자두부 침체 조사를 위하여 샘플당 100개의 정자를 위상차현미경 1000배하에서 관찰하였다. 정자두부 침체는 정상침체 정자 (normal apical ridge; NAR), 손상된 침체정자 (damaged apical ridge; DAR), 탈출침체 정자 (missing apical ridge; MAR), 손상침체 두부막 정자 (loose apical cap; LAC)로 분류하였다 (Pursel 등, 1972). 사출정자의 농후정자가 80% 이상의 운동성과 정상침체율 (NAR)을 가진 것만을 본 실험에 이용하였다.

다. 동결정액 제조

채취된 농후정액은 2시간에 걸쳐 실온 (22-23°C)으로 냉각시킨다. 정액을 15 ml tube에 취한 후 800×g에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버린다. Lactose, 난황, N-acetyl- D-glucosamine 으로 구성된 LEN 1차 희석액 (Yi 등, 2002)으로 1×10^9 sperm/ml 의 농도가 되도록 정자를 부유시킨 후, 희석된 정액을 5°C 냉장고에 2시간 동안 보관하여 냉각시킨다. 냉각 후, 1차 LEN 희석액에 4% glycerol 이 함유된 2차 LEN 희석액을 가하여 섞은 후, 즉시 5 ml의 정액을 straw에 주입하고, 구슬로 양 straw의 끝을 봉한다. Straw의 중앙에 공기층이 오도록 만든 후, 액체질소 상단으로부터 5cm 위치에 놓은 알루미늄 rack에 수평하게 놓고 20분간 전동결을 실시한다. 전동결이 끝난 straw는 액체질소통에 보관한다. 동결 straw는 52°C 수조에서 45초간 녹인 후 사용하였다.

라. Adenosine triphosphate (ATP) 분석

돼지정자의 ATP 분석을 위하여원정액, 액상정액, 동결정액을 준비하였다. 준비된 정액들은 mTLP-PVA를 1:3 (정액:mTLP-PVA)의 비율로 섞은 후, 120×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 다시 mTLP-PVA를 가하고, vortex한 후 다시 한번 120×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, mTLP-PVA를 넣고 섞은 후, 혈구계산판으로 정자농도를 계산하였다. 38°C로 가온된 mTLP-PVA로 정자농도를 2×10^7 /ml로 조정하고, 실험 전까지 5% CO₂, 38°C의 incubator에 보관하였다.

정자의 ATP 추출을 위하여 50 mM Tricine, 10 mM MgSO₄, 2 mM EDTA (pH 7.8)로 구성된boiling buffer를 800 ml 준비하여 100°C에서 끓였다. 200 ml의 정자를 넣은 후, 다시 100°C에서 끓이고, ice에서 10분간 방치하여 냉각시켰다. 냉각된 샘플을 4°C, 5000×g, 30분간 원심분리한 후 상층액만 취하여ATP 측정을 위한 reaction buffer를 가하기 전까지 냉장고 (4 °C)에 보관하였다.

ATP 측정을 위하여 시약은 ATP bioluminescence assay kit CLS II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하였다. 먼저 ATP 측정을 위하여 추출된 정자에 A reaction buffer를 가하고 30°C에서 30분간 두었다. 가온된 샘플을 100°C에서 3분간 끓이고, ice에서 실온으로 냉각시킨 후, 실온에 두었다. ATP standard 측정을 위하여 kit에 포함된 ATP standard solution 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M ATP 농도를 well에 분주하였다. 샘플들은 다기능 효소면역분석기 (HTS Multi label reader, Perkin Elmer LAS model, USA)의 발광도 700에서 10분간, 2회씩 측정하였다.

마. 자연교배와 내동성 정자의 수정능력 비교

미경산 종빈돈(Landrace 12두, Yorkshire 12두 : 계 24두)의 발정조사는 하루에 아침과 저녁 2회로 나누어 실시하였으며, 자연교배는 웅돈승가 허용시간을 기준으로 하여 승가허용시에 1차 교배를 실시하였고, 그 후 12시간 후에 2차교배를 실시하였다.

인공수정에 사용된 동결-융해정액은 운동성과 정상첨체가 50% 이상인 내동성 정자만을 사용하였으며, 인공수정은 웅돈승가 허용시간을 기준으로 하여 12시간 이후에 1차 인공수정을 실시하였으며, 그 후 12시간 후에 다시 2차 인공수정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

정자의 ATP 농도는 Table 1에 나타난 바와 같이 품종간에 차가 없었으나 Landrace 종과 Yorkshire 종에서 개체간에는 차이점을 인정할 수 있었다. ATP 농도는 10^8 정자당 nmol로 표시된 바, 원정액에서 Brackett와 Williams(1967)는 24.1-14.1, Brooks(1971)는 11.7-5.1, Garbers 등(1973)은 19.4, Pfetsch(1979)는 4.7~3.6, Aalbers 등(1985)은 33-25의 농도를 나타낸다고 보고 하였다. 동결정액에서 Aalbers 등(1985)은 분석시간에 따라 14.9~6.9의 농도를 나타낸다고 보고하였다.

Table 1. ATP content of fresh and frozen sperm from Yorkshire and Landrace boars

Boar No.	No. of Collection	ATP content(nmol/60 ⁸ sperm)	
		Fresh	Frozen-thawed
-Landrace-			
1	6	28.2±1.3 ^b	19.8±1.1 ^b
2	6	19.5±1.2 ^a	10.6±1.0 ^a
3	6	20.4±1.5 ^a	9.6±0.9 ^a
4	6	36.1±1.4 ^c	21.2±1.2 ^b
5	6	27.0±1.9 ^b	20.8±1.4 ^b
6	6	22.9±1.7 ^a	10.5±0.9 ^a
7	6	28.6±1.6 ^b	18.8±1.2 ^b
Mean(\bar{X})	42	26.1±1.5 ^y	15.9±1.1 ^x
-Yorkshire-			
8	6	19.0±1.7 ^a	10.9±1.1 ^a
9	6	18.9±1.8 ^a	9.6±0.9 ^a
10	6	27.7±1.5 ^b	19.7±0.8 ^b
11	6	26.2±1.4 ^b	20.2±1.0 ^b
12	6	35.8±2.1 ^c	21.6±1.1 ^b
13	6	29.1±1.4 ^b	11.0±0.8 ^a
Mean(\bar{X})	36	26.1±1.7 ^y	15.5±1.0 ^x

^{abc}Means±SE in the same column with different superscripts differ significantly(p<0.05).

^{xy}Means(\bar{X}) in the same row with different superscripts differ significantly(p<0.05).

Table 2. Comparison of ATP content of frozen boar sperm between more than 30% and below 30% motility

No. of Boars	No. of Collectin	Motility	ATP content(nmol/60 ⁸ sperm)
7	6	>30%	17.5±1.1 ^b
6	6	<30%	10.3±0.9 ^a

^{ab}Means±SE in the same column with different superscripts differ significantly(p<0.05).

이와같이 분석결과가 차이가 나는 것은 ATP 분석방법의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 동결정액은 원정액에 비하여 유의하게 낮은 ATP 농도를 나타내었다. 이와같은 결과는 소정자나 돼지정자에서 여러 연구자들에 의해서 얻어진 결과와 잘 일치하고 있다(Prinzen, 1977 ; Foulkes 와 MacDonald, 1979 ; Albers 등, 1985). Table 2에 나타난 바와같이 동결-융해정자에서 운동성이 30% 이상인 정자가 30% 이하인 정자보다 ATP의 농도가 높게 나타났다. 이와같은 결과는 ATP 농도와 정자의 운동성과는 밀접한 연관관계가 있음을 입증하고 있다.

Table 3. Comparison of fertilizing capacity between natural mating and artificial insemination by frozen-thawed boar sperm with more than 50% motility and normal acrosome.

Treatment	No. of gilts	Farrowing rate(%)	No. of pigs born alive per litter
Natural mating	12	83	9.8±0.07
Artificial insemination	12	75	7.3±0.05

Table 3에서는 자연교배와 정자가 동결-융해후 50% 이상의 운동성과 정상첨체를 가지는 동결정액을 가지고 인공수정한 결과가 나타나 있다. 인공수정이 자연교배보다 분만율에서는 약간 떨어지나 복당산자수에서는 차이가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 50% 이상의 운동성과 정상첨체를 가지는 내동성 정자는 인공수정에 이용될 수 있음이 입증되었다.

4. 결 론

정자의 ATP 농도는 품종간에는 차이가 없었으나 개체간에는 차이점을 인정할 수 있었다. 동결정액은 원정액에 비하여 유의하게 낮은 ATP 농도를 나타내었으며, ATP 농도와 정자의 운동성과는 밀접한 연관관계가 있었다. 동결-용해후 50%이상의 운동성과 정상첨체를 가지는 내동성 정자는 인공수정에 이용될 수 있음이 입증되었다.

제 12 절 인공수정센터의 적정규모와 경제성 분석

1. 서 론

전국에 29개의 인공수정센터가 있으나 규모가 다양하고 경우에 따라서는 경영이 부실한 인공수정센터로 있을 것으로 추정되어 이를 인공수정센터의 경영실태를 분석하고 센터별로 적정규모를 제시함으로써 센터의 경영개선에 자료를 제공하고 인공수정센터의 정책 자료를 제공하고자 본 분석을 실시하였다. 그러나 수차례 경영분석을 위한 자료제출을 요청하였으나 회수된 자료가 적어 일부 인공수정센터에 대한 경영분석과 적정규모를 분석하였다. 또한 자료요구에 응한 일부 인공수정센터는 비교적 규모가 크고 합리적인 경영을 하고 있는 센터로써 본 분석결과가 전체 인공수정센터의 경영 및 적정규모로 보기는 어려운 점이 있다. 따라서 본 분석 결과는 우리나라 인공수정센터 경영면에서 상위 계층에 있는 인공수정센터의 경영 및 적정규모의 분석결과로 보는 것이 바람직하다.

2. 재료 및 방법

가. 이용자료

전국 29개 AI센터의 손익계산 및 비용 분석 자료의 수집이 가능하다고 판단되는 12개 AI센터에 대해 AI센터의 적정규모와 경제성 분석을 위한 조사표를 송부한 결과 6개 AI센터에서 회신이 왔고 이중 자료가 부실한 2개는 제외하고 4개 AI센터에 대한 자료를 이용하여 분석을 실시하였다.

나. 분석방법

1) 적정규모 분석에 주로 쓰는 손익분기분석방법을 이용하고 이를 기준으로 한 경제성 분석을 실시하였다.

단 C 인공수정센터 경우는 2개 AI센터가 통합 재무제표를 사용하고 있어 통합하여 하나의 손익분기 분석을 실시하였다.

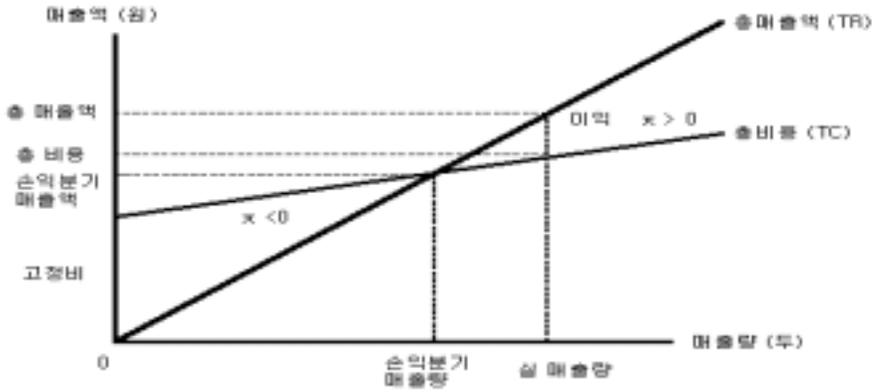


그림 1. 손익분기 분석도

2) 손익분석을 위한 고정비와 변동비의 산출 기준을 아래 표와 같이 작성하였다.

고정비	감가상각비 + 제조경비의 70% + 관리비의 70%
변동비	원재료비 + 제조경비의 30% + 관리비의 30%

3. 결과 및 고찰

가. 손익분기매출액과 실 매출액 비교

4개 인공수정센터 모두 실 매출액이 손익분기매출액을 초과하여 이익이 발생 하는 영역에서 경영하고 있었다.

표 1. 인공수정센터의 손익분기 매출액 비교

단위 : 천원

구 분	손익분기 매출액	실 매출액	총 비용	이 익
A 센터	505,963	< 601,715	532,406	69,309
B 센터	674,686	< 1,013,265	763,625	249,640
C 센터 (2개센터통합)	1,362,256	< 1,381,709	1,368,768	12,941

나. 4개 인공수정센터 모두 손익분기점을 상회하는 규모를 유지하여 이익이 발생하는 규모를 가지고 있었다.

다. 4개 인공수정센터의 실제 두당 고정비는 7,000~7,500원 으로 비슷하게 투자 되고 있었다.

표 2. 인공수정센터의 손익분기 매출양(두수) 비교

구 분	손익분기 매출량	실 매출량(1)	고정비(2) (천원)	두당 실고정비(2)/(1)(원)
A 센터	43,498두	< 51,730두	366,237	7,080
B 센터	47,744	< 71,704	497,460	6,938
C 센터 (2개 센터통합)	119,927	< 121,640	906,199	7,450

라. 손익분기점 산정기준은 별첨의 표 3, 4, 5 에 나타난 바와 같다.

첨부: 손익 분기점 산정기준 표

표 3. A인공수정센터 손익분기점 산정기준 표 단위 : 금액 : 원 , 수량 : 두

구 분		금 액	비 고
표준원가	고정비	7,080	1두당(고정비/수량)
	변동비	3,212	1두당(변동비/수량)
	합 계	10,292	
매 출	수 량	51,730	
	단 가	11,632	매출액 / 수량
	금 액	601,715,000	
비 용	고정비	366,237,300	
	변동비	166,168,700	
	총비용	532,406,000	고정비 + 변동비
이 익	한계이익	435,546,300	매출액 - 변동비
	영업이익	69,309,000	한계이익 - 고정비
손익분기점	한계이익율	0.2762	변동비 / 매출액
	1-한계이익율	0.7238	
	손익분기점	505,936,377	고정비 / (1-한계이익율)
손익매출	수 량	43,498	손익분기점 / 매출단가
	단 가	11,632	
	금 액	505,970,407	손익분기점
손익비용	고정비	339,794,677	손익분기점 - 변동비
	변동비	166,168,700	매출수량 * 두당변동비
	합 계	505,963,377	고정비 + 변동비

고정비	감가상각비(47,272,000), 제조경비의 70%(92,683,500), 관리비의 70%(17,369,800), 노무비(208,912,000)	366,237,300
변동비	원재료비(119,003,000), 제조경비의 30%(39,721,500), 관리비의 30%(7,444,200)	166,168,700

제조경비 : 보험료, 복리후생비, 수선비, 수수료, 영업비, 잡비, 차량비

표 4. B 인공수정센터 손익분기점 산정기준 표

단위 : 금액 : 원 , 수량 : 두

구 분		금 액	비 고
표준원가	고정비	6,938	1두당(고정비/수량)
	변동비	3,712	1두당(변동비/수량)
	합 계	10,650	
매 출	수 량	71,704	
	단 가	14,131	매출액 / 수량
	금 액	1,103,236,000	
비 용	고정비	497,460,800	
	변동비	266,164,200	
	총비용	763,623,000	고정비 + 변동비
이 익	한계이익	747,100,800	매출액 - 변동비
	영업이익	294,640,000	한계이익 - 고정비
손익분기점	한계이익율	0,2627	변동비 / 매출액
	1-한계이익율	0,7373	
	손익분기점	674,687,562	고정비 / (1-한계이익율)
손익매출	수 량	47,744	손익분기점 / 매출단가
	단 가	14,131	
	금 액	674,677,058	손익분기점
손익비용	고정비	408,523,362	손익분기점 - 변동비
	변동비	266,164,200	매출수량 * 두당변동비
	합 계	674,687,562	고정비 + 변동비

고정비	감가상각비(9,649,000), 제조경비의 70%(115,091,000), 관리비의 70%(24,698,800), 노무비(348,022,000)	497,460,800
변동비	원재료비(206,254,000), 제조경비의 30%(348,022,000), 관리비의 30%(10,585,200)	266,164,200

표 5. C (통합) 인공수정센터 손익분기점 산정기준 표. 단위 : 금액 : 원 , 수량 : 두

구 분		금 액	비 고
	고정비	7,450	1두당(고정비/수량)
표준원가	변동비	3,803	1두당(변동비/수량)
	합 계	11,253	
	수 량	121,640	
매출	단 가	11,359	매출액 / 수량
	금 액	1,381,709,000	
	고정비	906,199,130	
비용	변동비	462,569,235	
	총비용	1,368,768,365	고정비 + 변동비
이익	한계이익	919,139,765	매출액 - 변동비
	영업이익	12,940,635	한계이익 - 고정비
	한계이익율	0.33478	변동비 / 매출액
손익분기점	1-한계이익율	0.66522	
	손익분기점	1,362,255,820	고정비 / (1-한계이익율)
	수 량	119,927	손익분기점 / 매출단가
손익매출	단 가	11,359	
	금 액	1,362,255,820	손익분기점
	고정비	906,199,130	손익분기점 - 변동비
손익비용	변동비	456,056,690	매출수량 * 두당변동비
	합 계	1,362,255,820	고정비 + 변동비

* 고정비, 변동비, 산출기준은 A, B 인공수정 센터와 동일.

4. 결 론

4개 인공수정센터 모두 매출액이 손익분기매출액을 초과하는 영역에서 경영을 하고 있었다. 즉 손익분기점을 상회하는 규모를 가지고 이익을 창출하고 있었다. 다만 이를 3개 인공수정센터의 적정규모 분석결과를 우리나라 인공수정 센터를 상위계층에 속하는 센터의 경영분석 결과임으로 전체 인공수정센터의 적정규모 분석으로 보기는 어렵다는 점을 첨언한다.

제 13 절 응성페르몬 이용시 생산성 향상 효과 및 경제적 타당성 분석

1. 서 론

응성페르몬은 초임예정 모돈의 발정동기를 유도하는 물질로서 초임예정 모돈의 발정동기화를 촉진시킴으로서 발정기간을 단축시키고 이에 따른 사료비와 관리비 절감의 효과가 있다. 따라서 본 응성페르몬 이용의 경제성분석에서는 사료비와 관리비 절감에서 파생되는 생산성효과계측과 연차적으로 전체 초임예정 모돈을 대상으로 응성페르몬을 처리(이용)하였을 경우를 가정하여 응성페르몬 보급에 따른 경제적 타당성을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

가. 이용자료

본 연구에 사용된 종빈돈은 8개월령의 랜드레이스종으로 총 30두(응성페르몬 처리 15두, 무처리 15두)가 사용되었다. 그 시험 결과는 표 1과 같다.

표 1. 초임예정 모돈에 대한 응성페르몬 처리 후 발정영향

구 분	처 리	무처리	비고
실험한 초임예정 모돈수(A)	15두	15두	응성페르몬 처리로 발정율이 20%향상됨
발정 모돈수 (B)	11두	8두	
발정 비율 (B/A)%	73%	53%	

나. 경제성 분석을 위한 기초자료 산출

1) 응성페르몬 이용시 수익(추가수익)추정

응성페르몬 이용시 수익 증 경제적 효과를 ① 초산돈의 경우 응성페르몬 처리돈 재발정기간 21일이 단축되고 이에 따른 사료비절감 효과가 있고 ② 재발정기간이 단축됨에 따른 관리비용이 절감되는 효과가 있다.

○ 응성페르몬 이용시 총 수익 = ① 응성페르몬 이용시 총 사료비절감액 + ② 총 관리비용절감액
 = 1,288,636천원 + 305,576천원 = 1,594,212천원

· 응성페르몬 이용시 총 사료비절감액 =
 응성페르몬 이용시 총 발정두수 증가 × 연간사료비/두 × 응성페르몬 이용시 사
 료비 절감율
 = 57.3천두 × 394,549원/두/년 × 5.7% *
 = 1,288,636 천원

* 응성페르몬 이용시는 초산돈의 재발정기간 21일이 단축되므로 재발정기간 21
 일을 365일로 나누어 산출함.

표 2. 응성페르몬 이용시 발정두수증가 단위 : 천두

응성페르몬 이용시 초임예정 모돈의 발정두수 (A)	응성페르몬 불이용시 초임예정 모돈의 발정두수 (B)	응성페르몬 이용시 발정두수 증가 (A-B)
209.3천두 ㉞	152.0천두 ㉟	57.3천두

주1) 초임예정 모돈수는 2005년 6월말 현재 총 모돈수 956천두의 30%인 286.8천
 두로 추정하고 이에 응성페르몬 이용시 발정비율73%를 곱하여 산출함.

주2) 초임예정 모돈수 286.8천두에 응성페르몬 불이용시 즉 관행에 의한 초임예
 정 모돈의 발정 비율 53%를 곱하여 산출함.

· 응성페르몬 이용시 총 관리비 절감액
 = 두당관리비/년 × 응성페르몬 이용시 재발정기간 단축에 사료비 절감비율 × 응
 성페르몬 이용시 총 초임예정 모돈의 발정증가두수
 = 93,560원/년 × 5.7% × 57.3천두
 = 305,576천원

표 3. 응성페르몬 이용시 수익추정치

	두당수익 (원)	발정증가초임예정표 (천두)	총수익 (천원)
사료비절감수익	22,489원	57.3천두	1,288,636천원
관리비 절감수익	5,333	“	305,576
계	27,821	“	1,594,212

2) 응성페르몬 이용시 비용(추가비용)추정

본 연구의 현 단계에서는 응성페르몬 생산비의 산정이 어려워 기존 응성페르몬 제품의 판매가격을 응성페르몬 이용시 추가비용으로 추정하였다.

$$\begin{aligned} \text{○ 응성페르몬 이용시 총 추가비용} &= \text{초임예정 모돈1두당 응성페르몬 살포비용} \times \text{초임예정 모돈 수} \\ &= 2,280\text{원/두} * \times 286.8\text{천두} = 653,904\text{천원} \end{aligned}$$

* 기존 응성페르몬 제품은 75mg 1켤에 11,400원 하는데 이는 5두 살포량임. 기존제품 1켤은 30회를 살포할 수 있는데 1두당 2일 간격으로 3회 살포한다고 가정할 때 1켤은 5두 분으로 추계되어 1두당 응성페르몬 살포 비용은 2,280원 (11,400원/5)으로 추정되었다.

3) 응성페르몬 이용시 생산성 향상 효과 계측

앞에서 제시된 응성페르몬 이용시 수익과 비용을 종합한 수익성제고 즉 생산성 향상효과를 보면 표 4에서 보는 바와 같다.

응성페르몬 이용시 초임예정 모돈의 생산성 효과를 비용-수익을 비교한 추가순수익 개념으로 볼 때 두당 25,541원, 총 940,308천원으로 추정되었다.

표 4. 응성페르몬 이용시 생산성 향상 효과.

수익(A)		비용(B)		생산성 효과(A-B)	
두당수익	총수익	두당비용	총비용	두당효과	총효과
27,821원	1,594,212천원	2,280원	653,904천원	25,541원	940,308천원

또한 웅성페르몬의 발정동기화의 효과가 현장실증실험의 결과와 같게 나타날 경우 웅성페르몬 이용으로 비육돈의 경우에도 상당한 생산비절감 효과가 나타날 것으로 추정된다. 그러나 웅성페르몬을 이용하여 발정, 생산된 돼지고기의 품질이 우수하다는 연구결과를 발견하지 못하여 이 돼지고기의 시장차별화 전략은 세우지 않았다.

다. 경제성 타당성의 분석모형

본 절에서는 농업개발에 있어서의 경제적 타당성을 분석하는데 사용될 수 있는 일반적인 편익-비용 분석에 관련된 방법론(편익/비용비율(B/C ratio) 및 순현재가치 (NPV)를 이용하였다.

편익/비용 비율(B/C ratio)은 다음 식(1)과 같이 정의된다.

$$BC \text{ ratio} = \frac{PVB}{PVC} \dots\dots(1)$$

여기서 PVB(Present Value of Benefit)는 현재가치로 환산된 편익을 의미하며 동시에 PVC(Present Value of Cost)는 현재가치로 환산된 비용을 나타내고 이 두 항목은 적정 할인율 (r)을 이용하여 다음과 같이 표현된다.

$$PVB = B_0 + \frac{B_1}{(1+r)} + \frac{B_2}{(1+r)} + \dots + \frac{B_T}{(1+r)^T} = \sum_{t=0}^T \frac{B_t}{(1+r)^t} \dots\dots(2)$$

$$PVC = C_0 + \frac{C_1}{(1+r)} + \frac{C_2}{(1+r)} + \dots + \frac{C_T}{(1+r)^T} = \sum_{t=0}^T \frac{C_t}{(1+r)^t} \dots\dots(3)$$

(2)식과 (3)식의 편익과 비용은 일정기간, 0기부터 T기까지의 투자사업과 관련된 모든 편익과 비용의 합을 각각 의미함. 일정기간동안의 각 시점에서는 적정 할인율, r을 통해 현재가치로 환산됨. 그리고 편익에서 비용을 감한 순편익 현재가치(Net Present Value)는 다음과 같이 표현된다.

$$NPV = NPB - NPC = B_0 - C_0 + \sum_{t=0}^T \frac{(B_t - C_t)}{(1+R)^t} \dots\dots(4)$$

만일 NPV가 정의 값을 갖는다면 B/C ratio가 갖는 경제적 의미는 화폐비용 1단위에 따른 편익을 의미한다.

3. 결과 및 고찰

표 5. 웅성페르몬 이용시 경제성 분석 및 현금흐름표 (단위 : 천원)

항목	합계	보급년차 및 보급비율 *					
		0(0%)	1(20%)	2(40%)	3(60%)	4(80%)	5(100%)
수익 (명목가치)	1,594,212	0	318,842	318,842	318,842	318,842	318,842
비용 (명목가치)	923,904	270,000	130,781	130,781	130,781	130,781	130,781
수익 (현재가치 **) (a)	1,361,548	0	302,220	286,465	271,531	257,375	243,957
비용 (현재가치) (b)	828,471	270,000	123,963	117,500	111,357	105,568	100,065
순수익 (현재가치) (c=a-b)	533,077	-270,000	178,257	168,964	160,156	151,806	143,892
NPV	533,077						
B/C	1.64						

* 총 57.3천두 보급을 목표로 하며, 이 때의 총수익 및 총비용이 각각 1,594,212천원 및

653,904천원임을 가정함.

** 현재가치 환산시 할인율은 5%를 가정함.

*** 0년차의 비용은 초기 연구투자개발비용(270.000천원)임.

표 5에서는 웅성페르몬 이용시 경제성 분석결과를 요약한 표이다. 보급년은 총 6개년을 가정하였으며 첫 번째(0차년, 현재시점) 해에는 수익이 발생하지 않고, 그 이듬해부터 수익이 발생하여 웅성페르몬을 5년차 까지 매년 20%씩 보급률을 증가시켜나가는 것을 가정하였다.

분석결과, 사업의 순현재가치(NPV)가 533,077천원으로서 0보다 크므로 경제성이 있는 것으로 나타났다.

B/C 비율 또한 1.64로써 1보다 크므로 경제성이 있는 것으로 나타났는데, 이는 1원을 투자할 때 발생하는 수익이 1.64원이며 이 중 순수익이 64원 발생함을 의미한다.

본 분석에서는 다음 표 6에서와 같이 다양한 수준의 할인율(7% 및 10%)에서의 경제성 분석 결과를 감응도로 분석차원에서 분석하였으나, 분석 년 수가 상대적으로 짧은 이유에서 상기 5%할인율 기준시 결과와 별다른 차이를 발견하지 못하였다.

표 6. 응성페르몬 이용시 경제성의 감응도 분석

적용할인율	7%		10%	
	NPV	B/C	NPV	B/C
응성페르몬	501,090	1.64	442,901	1.58

4. 결 론

응성페르몬을 이용한 생산성향상 효과는 두당 25,541원/년이며, 전체 번식가능 초산돈으로 환산하면 940백만원/년으로 예측되었다.

제 14 절 내동성 정자 이용시 생산성 효과 및 경제적 타당성 분석

1. 서 론

번식돈에 우량 경제형질을 가진 내동성 정자를 이용하여 수정을 실시할 경우 돼지의 출하규격돈 도달일수가 단축되고 사료효율이 제고되는 등 생산성 향상 효과가 있다. 그러나 내동성 정자를 이용할 경우 산자수가 감소되는 역효과도 있다. 따라서 본 분석에서는 내동성 정자 이용시 정(+의 효과와 부(-)의 효과를 종합하여 내동성 정자의 생산성 향상 효과를 계측하고 이를 토대로 전 모돈에 연차적으로 보급했을 경우를 가정하여 경제적 타당성을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

가. 이용자료

본 분석에서는 충남대학교 박창식 교수의 연구자료를 토대로 표 1과 같이 추정하여 이용하였다.

표 1. 내동성 정자 이용시 효과

	내동성정자 이용시 (A)	일반정자 이용시 (B)	증감률($\frac{A-B}{B}$)%
120kg 규격돈 도달일수	160일	180일	△ 11.1%
1일 사료 급여량	3.0kg/두	3.5kg/두	△ 14.3%
모돈 1두당 산자수	7두	10두	△ 30 %

나. 경제적 분석을 위한 기초자료 산출

1) 내동성 정자 이용시 수익(추가수익) 추정

○ 수 익 = ① 출하규격돈 도달일수 감소효과 + ② 사료효율제고에 따른 사료비 절감 효과
- ③ 산자수 감소효과.

◇ 산출기준 (년/두)

- ① 출하규격돈 도달일수 감소에 따른 효과/년/두 = 사료비절감액 +관리비 절감액
= 21,256원 +1,090 원 =22,346원/120kg/년
· 사료비 절감액 = 95,748원/120kg × 11.1% × 2회/년 = 21,256원/120kg/년
· 관리비 절감액 = 4,908원/120kg × 11% × 2회/년 = 1,090원/120kg/년
- ② 사료효율제고에 따른 사료비 절감 효과/ 년/ 두
= 출하규격돈(120kg) 두당사료비 × 사료비절감비율 × 2회전/년
= 95,748원/120kg × 14.3% × 2 = 27,384원/120kg/년
- ③ 번식돈의 산자수 감소에 따른 수익감소/년/두
= 번식돈 1두당 자돈판매수입/년간 2회전 × 산자수
감소율 = 1,003,172원 × 30% = 300,950원/두

위와 같은 산출자료를 기초로 내동성 정자의 이용시 수익을 정리하면 표 2와 같다.

내동성 정자를 이용하여 수정을 하였을 경우

출하규격돈 도달일수 감소효과와 사료효율제고에 따른 사료비 절감 효과와 번식돈의 산자수 감소효과를 종합하여 보면

- ① 출하규격돈 도달일수 단축에 따른 수익증대효과와 사료효율제고에 따른 사료비 절감 수익을 합하여 비육돈 두당 49,730원, 총비육돈 기준 4천7백54억 원의 수익을 창출한 반면
- ② 번식돈의 산자수 감소에 따른 수익감소가 총번식도 기준 2천8백77억원의 손실이 발생, 이를 종합하여 보면 1천8백77억의 순수익 증대가 추정되었다.

표 2. 내동성정자의 이용시 추가수익 / 년

구 분	비용돈두당 수익(원/년2 회)①	번식돈 두수 (천두) ②	번식돈 두당 1회 이유두수 ③	총번식돈의 1회 자돈이유두수/ 년④ = ② X ③	총수익 ↓ (천원)① × ④
출하규격돈 도달일수 감소에 따른 수익	22,346원	956천두	10두	9,560천두	213,627,760천원
사료효율 제고에 따른 사료비 절감 수익	27,384원	956	10	9,560	261,791,040
소계(A)	49,730원	956	10	9,560	475,418,800
산자수 감소에 따른 수익감소(B)	-	-	-	-	287,708,200 ↓
총합(A-B)	-	-	-	-	187,710,600

주 1) 2005년 6월말기준

주 2) 번식돈 1두당 산자수 감소에 따른 수익 × 총번식돈수 = 300,950원/두 × 956천두
= 287,708,000천원

2) 내동성 정자 이용시 비용(추가비용)추정

내동성 정자를 이용하여 수정을 시킬 경우 스트로우 값이 추가되며 그 내용은 표 3과 같다

표 3. 내동성 정자 이용시 추가비용 / 년

구분	모돈 1두당 / 년	총모돈수	총비용
스트로우 값	10,000원 ↓	956천두	9,560,000천원

주1) 모돈1두당 스트로우 값 × 두당1회 수정시 사용되는 스트로우의 개수 × 2회/년
= 2개 × 2,500원 × 2회 = 10,000원

3) 내동성 이용시 생산성 향상 효과 계측

앞에서 제시된 내동성 정자의 이용시 수익과 비용을 종합한 수익성 제고 즉 생산성 향상효과를 보면 표 4에 제시된 바와 같다.

내동성 정자의 이용시 총생산효과를 비용-수익을 비교한 추가 순수익 개념으로 볼 때 총1천7백81억 원의 순수익이 증대되는 효과를 나타낼 것으로 추정되었다.

표 4. 내동성 정자 이용시 생산성 향상효과 / 년

총수익(A)	총비용(B)	총생산성 효과(A-B)
187,710,600 천원	9,560,000 천원	178,150,600 천원

또한 내동성 정자의 보급으로 비육돈 두당 생산비가 49,730원이 절감되어 그만큼 우리 돼지의 국제경쟁력이 향상될 수 있을 것으로 예상된다.

그러나 내동성 정자를 이용하여 생산한 자돈이 품질면에서 우수하다는 연구가 없어 시장차별화 전략은 의미가 없어 수행하지 않았다.

다. 경제적 타당성의 분석모형

본 절에서는 농업개발에 있어서의 경제적 타당성을 분석하는데 사용되는 일반적인 편익-비용 분석에 관련된 방법론(편익/비용비율(B/C ratio)) 및 순현재가치 (NPV)를 이용하였다.

편익/비용 비율(B/C ratio)은 다음 식(1)과 같이 정의된다.

$$BC\ ratio = \frac{PVB}{PVC} \dots\dots (1)$$

여기서 PVB(Present Value of Benefit)는 현재가치로 환산된 편익을 의미하며 동시에 PVC(Present Value of Cost)는 현재가치로 환산된 비용을 나타내고 이 두 항목은 적정 할인율(r)을 이용하여 다음과 같이 표현된다.

$$PVB = B_0 + \frac{B_1}{(1+r)} + \frac{B_2}{(1+r)^2} + \dots + \frac{B_T}{(1+r)^T} = \sum_{t=0}^T \frac{B_t}{(1+r)^t} \dots\dots (2)$$

$$PVC = C_0 + \frac{C_1}{(1+r)} + \frac{C_2}{(1+r)^2} + \dots + \frac{C_T}{(1+r)^T} = \sum_{t=0}^T \frac{C_t}{(1+r)^t} \dots (3)$$

(2)식과 (3)식의 편익과 비용은 일정기간, 0기부터 T기까지의 투자사업과 관련된 모든 편익과 비용의 합을 각각 의미함. 일정기간동안의 각 시점에 있어서의 현재가치는 적정 할인율, r을 통해 현재가치로 환산됨. 그리고 편익에서 비용을 감한 순편익 현재가치(Net Present Value)는 다음과 같이 표현된다.

$$NPV = NPB - NPC = B_0 - C_0 + \sum_{t=1}^T \frac{(B_t - C_t)}{(1+R)^t} \dots (4)$$

만일 NPV가 정의 값을 갖는다면 B/C ratio가 갖는 경제적 의미는 화폐비용 1단위에 따른 편익을 의미한다.

3. 결과 및 고찰

표 5. 내동성 정자 이용시 경제성 분석 및 현금흐름표 (할인율 5% 적용시) (단위 : 천원)

항목	합계	보급년차 및 보급비율 *					
		0(0%)	1(20%)	2(40%)	3(60%)	4(80%)	5(100%)
수익 (명목가치)	187,710,600	37,542,120	37,542,120	37,542,120	37,542,120	37,542,120	37,542,120
비용 (명목가치)	9,830,000	270,000	1,912,000	1,912,000	1,912,000	1,912,000	1,912,000
수익 (현재가치) (a)	160,315,532	0	35,584,948	33,729,808	31,971,382	30,304,628	28,724,766
비용 (현재가치) (b)	8,434,784	270,000	1,812,322	1,717,841	1,628,285	1,543,398	1,462,937
순수익 (현재가치) (c=a-b)	151,880,748	-270,000	33,772,626	32,011,967	30,343,097	28,761,229	27,261,829
NPV	151,880,748						
B/C	19.01						

* 총 956천두 보급을 목표로 하며, 이 때의 총수익 및 총비용이 각각 47,541,880천원 및 653,904천원임을 가정함.

** 현재가치 환산시 할인율은 5%를 가정함.
 *** 0년차의 비용은 초기 연구투자개발비용임.

내동성 정자 이용시 경제성 분석결과를 요약하면 표 5와 같다. 보급년은 총 6개년을 가정하였으며 첫 번째(0차년, 현재시점) 해에는 수익이 발생하지 않고, 그 이듬해부터 수익이 발생하며 내동성 정자는 5년차까지 매년 20%씩 보급률을 증가시켜 나가는 것을 가정한 것이다.

분석결과, 사업의 순현재가치(NPV)가 151,880,748천원으로서 0보다 크므로 경제성이 있는 것으로 나타났다.

B/C는 19.01로 나타났는데 이는 내동성정자의 개발보급에 1원을 투자할 때 발생하는 순이익이 19.01원이며 이 중 순수익 18.01원이 발생함을 의미한다.

본 분석에서는 다음 표 5에서와 같이 다양한 수준의 할인율(7% 및 10%)에서의 경제성 분석 결과를 감응도로 분석차원에서 분석하였으나, 상기 5%할인율 기준시 결과와 별다른 차이를 발견하지 못하였다.

표 5. 내동성 정자이용시 경제성의 감응도 분석

적용할인율	7%		10%	
	NPV	B/C	NPV	B/C
내동성정자	145,820,527	18.98	134,796,187	18.93

4. 결 론

우량 경제형질을 가진 내동성정자를 이용하여 인공수정을 실시할 경우 전체 번식가능 종빈돈으로 환산하면 1,781백만원/년으로 분석되었다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

근래 가축들의 생산과 수요를 조절하기 위한 “Control system technologies”의 수단으로 생물학적인 자극과 페로몬들의 역할에 관련한 연구의 일환으로 돼지를 포함한 포유동물의 페로몬과 냄새 성분을 감지하는 경로와 수용체들에 관한 괄목할 만한 연구가 이루어지고 있다. 제 1 세부과제는 음성 페로몬 물질의 탐색과 응용으로 음성 페로몬의 수용체로 알려진 타액 lipocalin(IGM6)를 가지고 다양한 화합물과의 virtual screening을 실시하여, 순수하게 소수성적인 상호작용만으로 결합할 수 있는 AQ 6060의 페로몬 물질을 얻었다. 결합 친화력 상수가 가장 높게 예측되었던 tetrahydrofuranlyoxycyclohexane (TFC-A)은 독성검사 결과 독성이 없었다. 미경산돈에서 음성 페로몬을 사용한 처리구가 사용하지 않은 처리구 보다 20%정도 더 높은 발정동기화현상을 나타내었다.

제 2 세부과제는 내동성 정자생산 종모돈의 내분비 및 세포학적 기전구명과 실용화로 FSH 농도가 낮을수록 정액생산량이 많았고, 혈청중 testosterone의 농도가 높을수록 동결-융해 정자의 운동성 및 정상 침체의 비율이 높았다. 세포막의 완전성과 미토콘드리아의 활성은 원정액과 동결정액에서 모두 세척배지와 세척온도가 중요하였다. Ca 이온의 유입과 방출기전의 이상은 정자의 동결보존시 정자내 Ca 이온의 고갈로 손상을 받았음이 입증되었다. 동결정액은 원정액에 비하여 낮은 ATP 농도를 나타냈으며, ATP 농도와 정자의 운동성과는 밀접한 연관관계가 있었다. 동결-융해후 50%이상의 운동성과 정상침체를 가지는 내동성 정자로 미경산돈에 인공수정한 결과 분만율은 75%, 복당생존자두수는 7.3두로 실용화 가능성이 입증되었다.

제 3 세부과제는 음성 페로몬 및 내동성 정자의 이용시 생산성 향상 효과 분석으로, 경제적 타당성 분석결과 두 연구 모두 편익/비용 비율이 1이상으로 경제적 타당성이 있는 것으로 나타났다.

이상으로 본 연구과제는 제 1 세부, 제 2 세부 및 제 3 세부가 모두 음성 페로몬과 내동성 정자개발에 의한 번식 및 관리 효율을 향상시킬 수 있는 방법을 개발 하므로써 100%의 연구목표를 달성하였다.

본 과제의 연구결과는 앞으로 돼지뿐만 아니라 포유동물의 번식 및 관리의 효율화, 난모세포의 체외수정, 수정란이식 그리고 형질전환 동물의 생산 등의 기초연구에 크게 기여할 것이다. 또한 본 연구에 관여하고 배출된 연구자들은 첨단 생물공학적 지식과 기술을 지닌 인력으로 대학, 연구소 및 산업체에서 위의 기술들을 이용한 연구 및 생산분야에서 중요한 역할을 담당할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 활용분야

- 가. 성 유인물질 개발과 연관된 연구분야 및 산업체
- 나. 내동성 및 비내동성 정자의 내분비학적 구명과 관련된 연구 및 산업분야
- 다. 동결정액 개발 관련 분야
- 라. 내동성 및 비내동성 정자의 생화학적 구명과 관련된 연구 및 산업분야
- 마. 수정란 이식 및 생명공학 연구분야
- 바. 돈육 시장의 차별화 전략 개발

2. 활용방안

- 가. 국내외 학술지 논문 발표를 통한 연구-산업계 보급
- 나. 연구결과를 이용한 특허권 획득
- 다. 우량 종모돈의 인공 수정을 통한 종돈개량
- 라. 성 유인물질을 통한 종빈돈 발정동기화 유도
- 마. 양돈 농가의 국제경쟁력 강화와 생산비 절감
- 바. 수정란 이식 및 생명공학 연구분야와의 연계
- 사. 축산기술 개발의 생산성 향상 효과 계측 모형 제시

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국외에서는 페로몬 물질을 사용하여 중빈돈들의 발정 동기화를 유도하거나 인공수정을 실시하여 중빈돈의 번식효율 증진은 물론, 관리개선과 생산성 향상을 기하기 위한 목적으로 boar pheromone spray (SOA)가 상품화 되었으나 내용물의 유효 성분이 기존의 돼지 웅성 페로몬 성분인 5 α -androst-16-en-3-one 과 5 α -androst-16-en-3-ol 이므로 대량 생산과 보급을 위한 목적으로 미흡하다.
2. 근래 가축들의 생산과 수요를 조절하기 위한 “control system technologies”의 수단으로 생물학적인 자극과 페로몬들의 역할에 관련한 연구의 일환으로 돼지를 포함한 포유동물의 페로몬과 냄새 성분을 감지하는 경로와 수용체들에 관한 팔목할만한 연구가 이루어지고있다. 뿐만 아니라, 상품화(PBS) 된 boar pheromone spray (SOA)를 사용한 결과, 재생산 효율이 개선되었다는 평가에 관한 연구도 보고된 바 있다.
3. 돼지의 대체 페로몬성 물질을 탐색하고 개발하기 위하여 돼지 웅성 페로몬, 5 α -androst-16-en-3-one (또는 5 α -androst-16-en-3-ol)의 수용체로 알려진 lipocalin과 결합하는 비천연 리간드들과의 도킹에 관한 뿐만 아니라, 냄새 물질과 결합하는 odorant binding protein (OBP) 간의 구조-활성관계에 관한 연구들이 활발하게 이루어 지고있으나 국내에서는 이와 관련한 연구가 전무한 실정이다.

제 7 장 참고문헌

1. Aalbers JG, Johnson LA, Aalbers-Smit EA and Rademaker JHM. 1985. ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and its relationship to sperm concentration and fertility. 1st Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Swedish Unibersity of Agricultural Science. Uppsala. pp 259-264.
2. Abraham MH, Gola JMR, Cometto-Muniz JE and Cain WS. 2002. A model for odour thresholds. Chem. Senses. 27: 95-104.
3. Akamatsu, M. 2002. Current state and perspectives of 3D-QSAR. Curr. Topics Med. Chem., 2, 1381-1394.
4. Allrich R.D and Christenson. 1981. Age differences in the response to hCG by porcine testicular tissue in vitro. Biol. Reprod. 24 (Suppl. 1):132.
5. Almlid T and Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. J. Anim. Sci. 66: 2899-2905.
6. Auger J Ronot X and Dadoune JP. 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. J. Androl. 10: 439-448.
7. Bolt DJ, Rollins R and Gulthrie HD. 1981. Development of a porcine FSH radioimmunoassay. J. Anim. Sci. 53 (Suppl. 1):298.
8. Booth WD. (1984) Sexual dimorphism involving steroidal pheromones and their binding protein in the submaxillary salivary gland of the Gottingen miniature pig, J. Endocrinol. 100, 195-202.
9. Brackett BG and Williams WL. 1967. ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. 125, 1133-1136.

10. Britt, JH, Kittok RJ and Harrison DS, 1974. Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. *J. Anim. Sci.* 37:915-919.
11. Brooks DE. (1971) Nucleotides in spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 25, 302-303.
12. Buck LB and Axel R. 1991. Novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1):175-187.
13. Buck LB. 2000. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611-618.
14. Buck LB. 2004. The search for odorant receptors. Commentary. *Cell* 116:S117-S119.
15. Chen H, Li Q, Yao X, Fan B, Yuan S, Pannaye A and Doucet JP. 2003. 3D-QSAR and docking study of the binding mode of steroids to progesterone receptor in active site. *QSAR Comb. Asi.*, 22, 604-613.
16. Cramer RD, Paterson DE and Bunce JD. 1988. Comparative molecular field analysis (CoMFA), 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 110: 5959-5967.
17. Clark M, Cramer III, RD, Jones DM, Patterson DE and Simeroth PE. 1990. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 2. Toward its use with 3D-structural databases, *Tetrahedron Comput. Methodol.*, 3: 47-59.
18. Clarke RN and Johnson LA. 1987. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. *Gamete. Res.* 16: 193-204.
19. Crabo BG and Dial GD. 1992. Artificial insemination in swine. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 8:533-544.

20. Dal Monte M, Centini M, Anselmi C, Pelosi P. 1993. Binding of selected odorants to bovine and porcine odorant-binding proteins. *Chem. Senses* 18:713~721.
21. Desiraju GR, Gopalakrishnan B, Jetti RKR, Nagaraju A, Raveendra D, Sarma JA, RP, Sobhia ME and Thilagavathi R. 2002. Computer-aided design of selective COX-2 inhibitors: comparative molecular field analysis, comparative molecular similarity indices analysis, and docking studies of some 1,2-diarylimidazole derivatives. *J. Med. Chem.* 45:4847-4857.
22. Desiraju GR, Gopalakrishnan B, Jetti RK, R, Nagaraju A, Raveendra D, Sarma JA, RP, Sobhia ME and Thilagavathi R. 2002. Computer-aided design of selective COX-2 inhibitors: comparative molecular field analysis, comparative molecular similarity indices analysis, and docking studies of some 1,2-diarylimidazole derivatives. *J. Med. Chem.* 45:4847-4857.
23. Diehl JR, Day BN and Stevermer EJ. 1979. Artificial Insemination in Swine. *Pork Industry Hand book* no. 64.
24. Dorries KM, Adkins-Regan E and Halpern BP. 1995. Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiology & Behavior* 57(2):255-259.
25. Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 279-280.
26. FlorCruz SV and Lapwood KR. 1978. A longitudinal study of pubertal development in boars. *Int. J. Androl.* 1:317.
27. Ford JJ, Wise TH and Lunstra DD. 1997. Negative relationships between blood concentrations of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. *J. Anim. Sci.* 75:790-795.

28. Foulkes JA and MacDonald BJ. 1979. The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 11, 313-319.
29. Garbers DL, First NL and Lardy HA. 1973. The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Biol. Reprod.* 8, 589-598.
30. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA and Pace MM. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod.* 34:127-138.
31. Garner DL, Johnson LA and Allen CH. 1988. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology.* 30: 369-378.
32. Gower DB and Booth WD. 1986. Salivary pheromones in the pig and human in relation to sexual status and age, in *Ontogeny of olfaction: principles of olfactory maturation in vertebrates* (Breipohl, W., ed.) pp. 255-264, Springer-Verlag, Heidelberg.
33. Gower DB and Hancock MR. 1982. In: *Olfaction and Endocrine Regulation*, Breipohl, W. (Ed.), pp. 267-277, IRL Press, London.
34. Granham EF, Crabo BG and Pace MM. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Biennial Symp. Anim. Reprod. J. Anim. Sci.* 47 (Suppl. II):80-119.
35. Greenwood FD, Hunter WM and Glover JS. 1963. The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89:114.
36. Hancock MR, Gennings JN and Gower DB. 1985. On the existence of receptors to the pheromonal steroid, 5 α -androst-16-en-3-one, in porcine nasal epithelium. *FEBS Lett.* 181(2):328-334.

37. Hansch C and Leo A. 1995. Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, Washington, DC.
38. Hemsworth PH and Barnett JL. 1990. Behavioural responses affecting gilt and sow reproduction. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*. 40:343-354.
39. Herent MF, Collin S and Pelosi P. 1995. Affinities of nutty and green-smelling pyrazines and thiazoles to odorant-binding proteins, in relation with their lipophilicity. *Chem. Senses*, 20: 601-608.
40. Hofmo PO and Almlid T. 1991. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. In *Boar Semen Preservation, Vol. 2, Proceedings of the 2nd International Congress on Boar Semen Preservation*. *Reprod. Domest. Anim.* 1: 111-122.
41. Hood RD, Foley CW and Martin TG. 1970. Effects of cold shock, dilution, glycerol and dimethyl sulfoxide on cation concentrations in porcine spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 30:91-94.
42. Hughes P and Varley K. 1980. *Reproduction in the Pig : Fertility in the male*. pp.187-195.
43. Johnson LA. 1980. Artificial insemination of swine : Fertility with frozen boar semen. *Int. Pig Vet. Conger. (Copenhagen)* p. 37.
44. Johnson LA. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa, 1970 to 1985. *First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala*, pp. 199-222.
45. Kansy M. 1996. Molecular properties. In: *structure-property correlations in drug research*, Waterbeemed, H. V. D. (Ed.), Academic press, Austin.
46. Kellogg GE, Semus SF and Abraham DJ. 1991. HINT: A new method of empirical field calculation for CoMFA. *J. Comp. Aided Mol. Design*, 5: 545-552.

47. Kerr R 1994. Parallel helix bundles and ion channels: Molecular modeling via simulated and restrained molecular dynamics. *Biophys. J.*, 67: 1501-1515.
48. Kesler DJ, Garverick HA, Youngquist RS, Elmore RG and Bierschwal CJ. 1977. Effects of days postpartum and endogenous reproductive hormones on GnRH-induced LH release in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 45:797-803.
49. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR and Bajorath J. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews.*,3, 935-949.
50. Kramer RY, Garner DL, Bruns ES, Ericsson SA and Prins GS. 1993. Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh, 24-hour extended and cryopreserved human spermatozoa. *J. Androl.* 14: 374-384.
51. Krzymowski T, Grzegorzewski W, Stefańczyk-Krzymowska S, Skipor J and Wasowska B. 1999. Humoral pathway for transfer of the boar pheromone, androstenol from the nasal mucosa to the brain and hypophysis of gilts. *Theriogenology* 52:1225-1240.
52. Kubinyi H. 1993. 3D QSAR Drug Design, Theory, Methods and Applications, ESCOM. Leiden.
53. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
54. Larsson K. 1978. Current research on the deep freezing of boar semen. *World Rev. Anim. Prod.* X IV:59-64.
55. Lowis DR. 1997. HQSAR. A new, highly prediction QSAR technique. *Tripos Technical Notes*, Vol. 1., No. 5.
56. Lunstra DD, Ford JJ and Wise TH. 1996. Selection for extremes in serum FSH concentrations results in reduced testis size and fertility on Meishan

- and White Composite boars. In : Tumbleson and Schook (Ed.) *Advances in Swine in Biomedical Research*. pp. 523-531. Plenum Press, New York.
57. Mariscal DV, Wolfe PL, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Fike KE, Sanchez T, Wehrman ME, Johnson RK, Kittok RJ, Ford JJ and Kinder JE. 1996. Comparison of circulating concentrations of reproductive hormones in boars of lines selected for size of testes or number of ovulations in respective control lines. *J. Anim. Sci.* 74:1905-1914.
 58. Marshall GR, Barry CD, Bosshard HE, Dammkoehler RA and Dunn DA. 1979. The conformational parameter in drug design: active analog approach. In: *Computer-assisted drug design.*, Olsen, EC. and Christoffersen, RE. (Ed.), American Chemical Society, Washington, D.C. 205-226.
 59. Marvogenis AP and Robinson OW. 1976. Factors affecting puberty in swine *J. Anim. Sci.* 42:1251-1255.
 60. Matyus L, Szabo JG, Resli I, Gaspar JR and Damjanovich S. 1984. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung.* 19:209-214.
 61. May A, Eisenhardt S, S.-Ethrenberg J and Cordes F. 2003. Rigid body docking for virtual screening. *ZIB-Report 03-47*, 1-29. Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin.
 62. Melrose DR, Reed HC and Patterson RL. 1971. Androgen steroids associated with boar odour as an aid to the detection of oestrus in pig artificial insemination, *Br. Vet. J.* 127, 497-502.
 63. Meyer AY and Richard WG. 1991. Similarity of molecular shape. *J. comput. Aided Mol. Design* 5(5):427-439.
 64. Morris GJ and Wastson PF. 1984. Cold shock injury a comprehensive bibliography. *Cryo-Letters.* 5: 352-372.

65. Niswender GD, Reichert LE and Zimmerman DR. 1970. Radioimmunoassay of serum levels of LH throughout the estrus cycle in pigs. *J. Endocrinol.* 87:576-580.
66. Ogier De Baulny B, Le Vern, Y. Kerboeuf D and Maisse G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 34:141-149.
67. Pantages E and Dulac C. 2000. A novel family of candidate pheromone receptors in mammals. *Neuron* 28:835-845.
68. PBS: The leader in animal health & nutrition, PBS Animal Health, PO Box 9101, Canton, Ohio 44711-9101. USA.
69. Pelosi P and Tirindelli R. 1989. Structure/Activity Studies and Characterization of an Odorant-Binding Protein. *Chemical Senses*, Vol. 1. In: Receptor events and transduction in taste and olfaction., Brand JG, Teeter JH, Cagon RH and Kare MR (Eds.), Marel Dekker, New York., Ch. 10., 207-226.
70. Perrin DD and Armarego WLF. 1988. Purification of Laboratory Chemicals. (3rd Ed.) Pergamon Press, Oxford.
71. Petchy AM and English PR. 1980. A note on the effects of boar presence on the performance of sows and their litters when penned as groups in late lactation. *Anim. Prod.* 31:107-109
72. Pevsner J, Hou V, Snowman AM and Snyder SH. 1990. Odorant-binding protein, characterization of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 265:6118~6125.
73. Pfetsch J. 1979. Zur ATP-Bestimmung in Sperma einiger Haustierarten mit dem Biolumineszenzverfahren. *Vet. med. Diss.*

74. Pinkel D, Dean P, Lake S, Peters D, Mendelsohn M, Gray J, Van Dilla M and Gledhill B. 1979. Flow cytometry of mammalian sperm: progress in DNA and morphology measurement. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 353-358.
75. Polge C, Salamon S and Wilmot I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87:424-428.
76. Prinzen R. 1977. ATP-Bestimmung mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien. *Zuchthyg.* 12, 105-108.
77. Pursel VG. 1979. Advances on preservation of swine spermatozoa. In: H. W. Hawk (ed.) *Beltsville Symposia III. Animal Reproduction*, Allanheld, Osmun and Co., Montclair, NJ. pp. 145-157.
78. Pursel VG and Johnson LA. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1:63.
79. Pursel VG and Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40:99-102.
80. Pursel VG, Johnson LA and Borkovec AB. 1975. Effects of invitro treatment of boar spermatozoa with TEPA on the fertilization and development of pig eggs. *J. of Reprod. Fert.* 45:549.
81. Pursel VG, Johnson LA and Rampacek GB. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34: 278-283
82. Pursel VG and Park CS. 1985. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa, 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala. pp. 147-166. procedure. *J. Anim. Sci.* 40: 99-102.
83. Pursel VG and Park CS. 1987. Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen on 5 ml maxi-straws. *Theriogenology* 28:683-690.

84. Quinn PJ and White IG. 1966. The effects of cold shock and deep freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 12:263-270.
85. Rarey M, Kramer B, Lengauer T and Klebe G. 1996. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* 261(3):470-489.
86. Reddy MR and Parrill AL. 1999. Overview of rational drug design. In *Rational Drug Design*. Ch. 1., ACS Symposium Series 719, American Chemical Society, Washington, DC.
87. Reed HC, Melrose DR and Paterson RLS. 1974. Androgen steroids as aid to the detection of estrus in pig artificial insemination. *Br. Vet. J.*, 130, 61-67.
88. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO and Sekoni VO. 2001. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 65:157-170.
89. Robertson DH, Cox KA, Gaskell SJ, Evershed RP and Beynon RJ. 1996. Molecular heterogeneity in the Major Urinary Proteins of the house mouse *Mus musculus*, *Biochem J.* 316, 265-272.
90. Roldan ERS and Harrison RAP. 1989. Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca^{2+} /ionophore-induced acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochemical Journal* 259:397-406.
91. Romanowicz K, Stupnicki R, Barcikowski B, Madej A and Walach M. 1976. Plasma testosterone and LH in growing boars. *Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. Artificial Insem.*, Cracow, Poland.
92. SAS Institute Inc. 1996. *SAS/STAT guide for personal computer 6.12*. SAS Inst. Inc., Cary, NC., USA.

93. SAS Institute Inc. 1996. The SAS system for Windows, Release 6.12, Cary, NC, USA.
94. Schinckel AP, Johnson RK and Kittok RJ. 1984. Testicular development and endocrine characteristics of boars selected for either high or low testis size. *J. Anim. Sci.* 58:675-685.
95. Shrestha NP, Edwards SA, English PR and Robertson JF. 2001. An evaluation of boar pheromone spray to aid the stimulation and detection of estrus in small farms in Nepal. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14(5):697-700.
96. Signoret JP. 1970. reproductive behaviour of pigs. *J. Reprod. Fertil.* (suppl. 11). pp.105-117.
97. Sihra TS, Bogonez E and Nicholis DG. 1992. Localized Ca²⁺ entry preferentially affects protein depolarization, phosphorylation and glutamate release. *Journal of Biological Chemistry* 267:1983-1989.
98. Spinelli S, Vincent F, Pelosi P, Tegoni M and Cambillau C. 2002. Boar salivary lipocalin: Three-dimensional X-ray structure and androstenol/ androstenone docking simulations. *Eur. J. Biochem.*, 269: 2449-2456.
99. Stahle L and Wold S. 1988. Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research, *Progr. Med. Chem.* 25: 292-334.
100. Stevenson, JS and Davis DL. 1984. Influence of reduced litter size and daily litter separation on fertility of sows at 2 to 5 weeks postpartum. *J. Anim. Sci.* 59:284-293.
101. Sung ND and Song SS. 2003. Range of physicochemical parameters for active ingredients of herbicides. *Kor. J. Pestic. Sci.* 7(1):58-65.
102. Sung ND, Kim CH, Jin DI and Park CS. 2004. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: I. Ligand based molecular shape similarity of 5 α -androst-16-en-3-one analogues and their physicochemical parameters. *Reprod. Dev. Biol.* 28: 45-52.

103. Sung ND, Park CS, Choi YS and Myung PK. 2005. The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: II. Holographic QSAR model for binding affinities between ligands of volatile odorants molecules and porcine odorant binding protein (pOBP). *Reprod. Dev. Biol.* 29: 43-48.
104. Sung ND. 2002. Development of new agrochemicals by quantitative structure-activity relationship (QSAR) methodology. II. The linear free energy relationship (LFER) and descriptors. *Kor. J. Pesticide Sci.*, 6: 231-243.
105. Swine Research. Texas Tech University, Agricultural Sciences Technical Report No. i-5-125, 1977.
106. Sybyl (Ver. 6.92), Tripos Associates, Inc., 1699 S. Hanley Rd., Suite 303, St. Louis, MO. 63144-2913.
107. SYBYL 6.6. 1999. Molecular Modeling Software, Tripos Inc., USA.
108. Taylor R and Kennard O. 1984. Hydrogen-bond geometry in organic crystals. *Acc. Chem. Res.*, 17, 320-326.
109. Thomas P and Meizel S. 1989. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochemical Journal* 264:539-546.
110. TOPKAT (The open practical knowledge acquisition toolkit), Accelrys Inc., Web. <http://www.accelrys.com>
111. TSAR 3.2. 1999. Oxford Molecular Limited, USA.
112. Vincent F, Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Pelosi P, Cambillau C and Tegen M. 2000. Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes, *J. Mol. Biol.* 300: 127-139.

113. Von Rohloff D. 1973. Ein Beitrag zur Beurteilung der Taeglichen Spermienproduktion beim Ebern der Deutschen Landrasse. Zuchthygiene 8:72-75.
114. Watson PF and Plummer JM. 1985. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala. pp. 113-127. Mol. Reprod. Dev. 31: 68-71.
115. Yi YJ, Kwon YA, Ko HJ and Park CS. 2002. Effects of diluent component, freezing rate, thawing time and thawing temperature on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(11):1553-1558.
116. Yi YJ, Ko HJ, Lee SH, Yang CB, Son DS, Kim HK and Park CS. 2004. In vitro fertilization and development of pig oocytes inseminated with boar sperm by different sperm washing media after thawing of the frozen straws. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17: 164-167
117. Yoshida M, Ishigaki K and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro.
118. Zanella E, Lunstra D, Wise T, Kinder J and Ford J. 1999. Testicular morphology and function in boars differing in concentrations of plasma follicle-stimulating hormone. Biol. Reprod. 60:115-118.
119. Zimmerman DR. 1976. Effect of transport phenomenon, boar contact.. Nebraska Swine Report, University of Nebraska, Lincoln, E. C. 76-219:12.
120. Zirkin BR, Awoniyi C, Griswold MD, Russell LD and Sharpe R. 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? J. Androl. 15:273.
121. 김영식, 생산경제학, 박영사, 1995.
122. 농림기술관리센터, 농림기술개발사업의 경제성 평가 및 생산관리시스템 개발, 2000, 11.

123. 박홍립, 미시경제학, 박영사, 1982.
124. 성낙도, 김철호, 진동일, 박창식. 2004. 생물학적 자극 통제수단으로서 활용하기 위한 돼지 페로몬성 냄새 물질의 탐색: 1. 5 α -androst-16-en-3-one 유사체들의 리간드에 기초한 분자 유사성과 물리-화학 파라미터. 한국동물번식학회지, 28(1), 45-32.
125. 성낙도, 박창식, 최양석, 명평근. 2005. 생물학적 자극 통제수단으로서 활용하기 위한 돼지 페로몬성 냄새 물질의 탐색: II. 휘발성 냄새분자의 리간드와 Porcine Odorant Binding Protein (p-OBP) 사이의 결합 친화력에 관한 홀로그래피적 QSAR 모델. 한국동물번식학회지, 29(1), 43-48.
126. 성낙도, 박창식, 정훈성, 성민규. 2006a. 생물학적 자극 통제수단으로서 활용하기 위한 돼지 페로몬성 냄새 물질의 탐색. III. 2-(Cyclohexyloxy)tetrahydrofuran 유도체와 p-OBP 사이의 결합 친화력에 관한 비교 분자장 분석. 한국 동물번식학회지, 30(1), 13-19.
127. 성낙도, 장석찬, 정훈성. 2006b. 생물학적 자극 통제수단으로서 활용하기 위한 돼지 페로몬성 냄새 물질의 탐색. IV. 2-(Cyclohexyloxy)tetrahydrofuran 유도체와 p-OBP 사이의 결합 친화력에 관한 비교분자 유사성지수 분석. 한국응용생명화학학회지, 49, 투고중.
128. 성낙도, 박창식, 김찬경, 박형연. 2006c. 생물학적 자극 통제수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬성 냄새 물질의 탐색. VI. Salivary Lipocalin으로부터 돼지 페로몬 결합 단백질에 관한 분자 동역학적 모의실험과 Virtual Screening 방법. 미발표 자료.
129. 임재환, 농업투자분석론, 선진문화사, 1997.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.