

A Study on the Decondensation and Pronucleus Formation of Sperm Nucleus in the Mouse Oocyte

Hee Gyo Kang^{*1}, Tai Jeon Kim¹, Hyung Joon Bae¹, Hi Joo Moon¹, Ho Joon Lee^{2,3},
Hye Young Yang⁴ and Moon Kyoo Kim⁴

¹Department of Medical Technology, Seoul Health College, Kyunggi-do, ²Eulji Medical Science Institute, Eulji Medical Center, Seoul, ³Department of Physiology, School of Medicine, Eulji University, Taejeon,

⁴Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea

To investigate the ability to decondense sperm head penetrated into cytoplasm of the oocytes and the relationship between this ability and the level of glutathione (GSH) in mouse oocyte at various maturing stages. The fertilizability of oocytes at various stages of maturation, the decondensation of sperm nucleus and the formation of male pronucleus, were observed and the levels of GSH were measured in oocyte at same stages. Besides, the relation between fertilizability and level of GSH in oocyte cytoplasm treated with L-buthionine-S, R-sulfoximine (L-BSO), the inhibitor of biosynthesis of GSH, was determined. The decondensation of sperm head was not found in GV stage and L-BSO treated oocytes. In maturing oocytes (GVBD, MI), the decondensation was found, but the formation of male pronucleus was not. The levels of GSH in oocyte cytoplasm were measured; 2.2 pmol per oocyte in the ovulated and the matured *in vitro* each, 1.0 pmol in GV intact oocyte, 1.3 pmol in GVBD, and 1.5 pmol in MI phase oocyte. In L-BSO treated oocytes the levels of GSH were measured 0.08-0.09 pmol per oocyte, slightly lower than GV stage oocyte. In conclusion, GSH in oocyte is supposed to be synthesized and stored in cytoplasm during maturation. The failure of decondensation in the cytoplasm of GV stage and L-BSO treated is suggested that GSH is an essential factor in decondensing the sperm head and that a certain level of GSH, more than in GV oocyte cytoplasm, is required in decondensation.

Key Words: Glutathione (GSH), Decondensation, L-buthionine-S,R-sulfoximine (L-BSO), Oocyte

서 론

포유류의 정자형성과정에 있어서 초기 정세포 (spermatid) 핵 내 핵단백질인 histone은 arginine과 cysteine이 풍부한 분자량 500~700 dalton 정도인 protamine으로 대체된다^{11,21}. 정소에서 형성된 디성숙 정자는 부정소로 이동되면서 핵 내에서의 생화학적인 변화를 겪게 된다. 특히, protamine 내 cysteine의 sulfhydryl기 sulfhydryl기의 산화작용으로 인하여 정자의 핵 내에 많은 수의 disulfide bond가 유발되어 정자핵이 응축되는데, 정자의 성숙정도에 따라서 정자핵 내 disulfide bond의 수는 증가되고 응축정도 역시 강해진다고 보고되었다^{3,4}. 포유류의 정자핵의 안정성은 정소 내 정자형성과 부정소 내의 정자성숙 과정에서 핵단백질의 이와 같은 변화에 기인되는 것으로 사료된다. 또한 전립선으로부터 공급되는 Zn⁺⁺과 같은 이온은 세포

막 및 핵에 들어가 막의 안정성 및 핵응축에 관여하는 것으로 보고되었다^{7,25,29-31}).

탈응축 현상은 이러한 응축의 역과정으로서 disulfide bond가 분리되고²⁴, 핵단백질인 protamine이 histone으로 다시 환원되는 과정이라고 밝혀졌다^{25,26}.

성숙한 난자는 세포질 내에 탈응축 및 전핵형성에 대한 능력을 갖고 있으며, 탈응축을 유발시키는 요인을 sperm nucleus dependencing factor (SNDF)라 하였고, 전핵형성에 대한 요인은 sperm pronucleus development factor (SPDF)라 하였다^{7,25,29-31}. SNDF는 난자가 성숙하는 과정에서 발현되고, 성숙과 함께 증가되며 수정 직후 사라진다고 보고되었다^{20,29-31,33}. SPDF는 난자의 성숙 및 세포질의 활성화와 깊은 관련이 있는 것으로 보고되었다^{2,10,15,16}. 난자는 난포에서의 성장 및 성숙과정에서 여러 가지 형태적, 생화학적 및 생리적 변화를 거친다. 즉 난구세포와의 관계, 세포질 내 소기관의 분포양상과 RNA 및 단백질의 합성, 분해와 축적 그리고 합성된 단백질의 변형이 일어나는데, 이러한 변화들은 난자의 성숙과 수정 및 배아의 발생을 조절하는 데 관련이 있는 것으로 보고되었다^{17,19,29-31}. 그러나 이러한 변화들이 어떠한 기작으로 탈응축 및 전핵

*논문 접수: 2001년 11월 24일

수정재접수: 2001년 12월 22일

†별책 요청 저자: 강희규

"이 논문은 2001년도 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었음."

형성을 유도 조절하는 지는 잘 알려져 있지 않다. 다만 난자의 성숙의 시작인 핵막붕괴 (germinal vesicle breakdown: GVBD)가 발현의 분기점이며, 성숙 중 양적으로 증가하고, 수정 직후 사라진다고 보고하였다^{13,14}. 그러나 최근의 보고²⁶에 의하면 전핵상태의 수정란도 탈응축을 시키고 전핵을 형성할 수 있다고 보고되었다. 또한 이러한 능력이 합성인지 또는 비활성 물질의 활성화인지는 알려진 바 없다. 그리고 탈응축 및 전핵형성의 여부 및 그 정도를 아는 것은 매우 중요하다.

정상적인 수정이 일어날 때, 정자핵은 난자의 세포질 내에서 탈응축 및 전핵형성의 과정을 거치게 되는 데 이는 난자의 성숙도와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다⁷. 즉 성숙한 난자는 한 개 또는 여러 개의 정자를 탈응축 및 전핵형성시킬 수 있는 능력이 있으나^{22,23}, 핵막을 갖고 있는 미성숙 난자는 정자핵을 탈응축 시키지 못하는 것으로 보고되었다²⁶. 즉 난자성숙의 초기 변화인 핵막붕괴는 정자핵 탈응축 및 전핵형성능력의 발현과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다

^{13,14}. 그러나 SNDF가 GVBD와 동시에 합성되는지, 아니면 기존의 요인이 활성화에 의해 발현되는지는 알려져 있지 않다. 또한 성숙과 함께 양적으로 증가한다는 보고²⁶에 의하면 합성 축적되는 어떤 물질이라 추측된다. 그러나 수정 직후에 사라졌다 분열과정에서 다시 나타난다는 보고에 의하면 물질의 합성 및 소멸과의 관계가 아닌 활성 및 불활성의 기작으로 생각되나 SNDF의 본성과 기작에 대해 정확히 밝혀진 바 없다.

한편, 난자의 세포질 내에 free thiol group을 갖고 있는 환원 glutathione (GSH)은 정자핵단백질내 disulfide bond의 환원에 깊은 관련이 있는 것으로 보고되었다²⁶. GSH는 난자뿐 아니라 체세포 세포질 내에 존재하며 세포주기에 따라 양적으로 변화하는 것으로 보고되었다. 또한 GSH는 *in vitro* 상태에서도 탈응축반응을 유도할 수 있는 생리적인 물질로 보고되었다²⁷. 그러나 glutathione이 SNDF 자체인지에 관한 직접적인 증거는 없다.

그 외에도 난자에 존재하는 특정 효소가 탈응축에 관련이

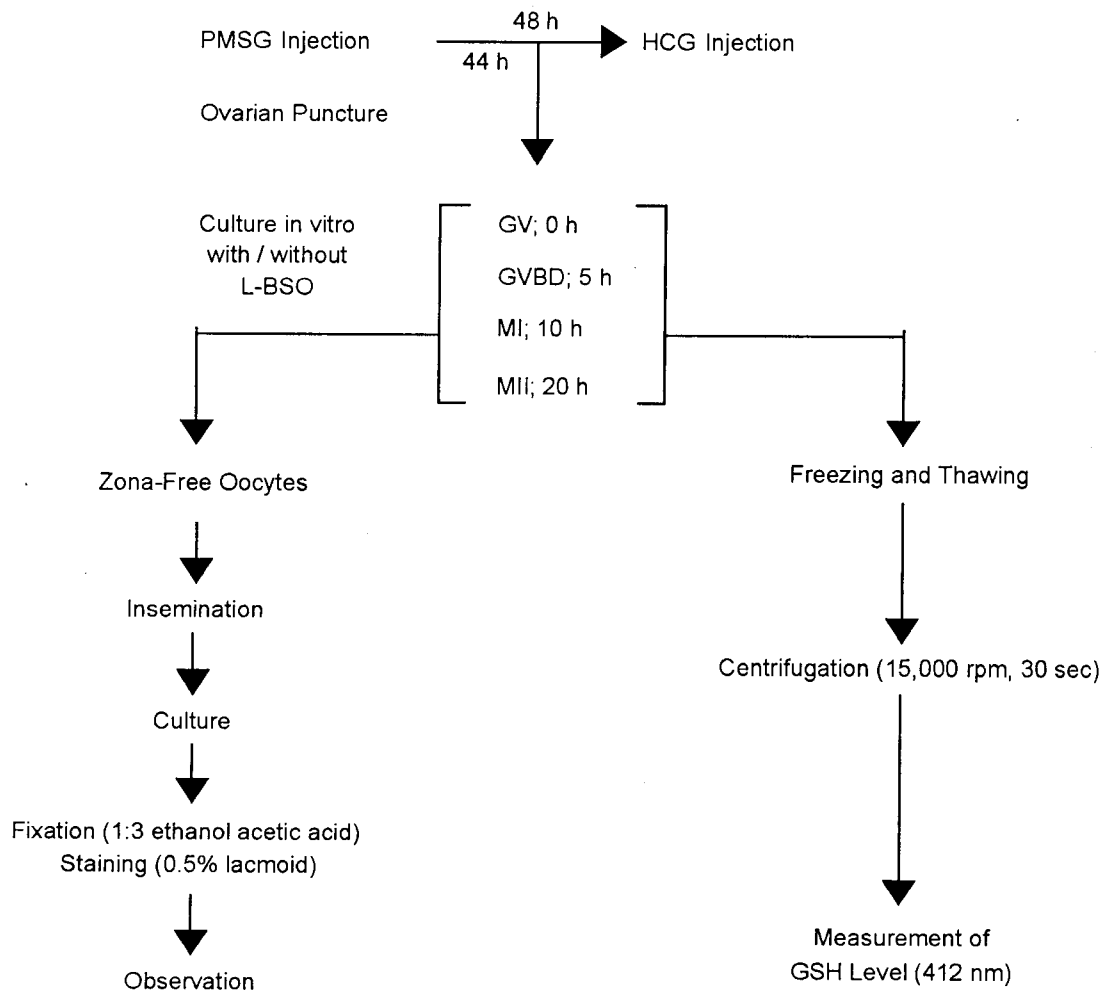


Fig. 1. Flow chart of experiment

있다는 보고²⁴⁾뿐 아니라 난자의 성숙에 필수적인 이온으로 알려진 Ca^{++} 이온도 탈응축기작과 관계가 있는 것으로 보고되었다^{5,24,30,31)}. 그러나 이들이 탈응축반응의 직접적인 조절물질은 아니라고 추측되며, 아마도 난자성숙 또는 glutathione 대사의 조절에 관련이 있을 것으로 사료된다.

따라서 난자 내 정자핵의 탈응축 및 전핵형성을 유발시킬 수 있는 요인을 밝히기 위해서 먼저 난자가 성숙과정 중에 이러한 능력의 발현 및 소멸되는 시기를 알아보고, 관련된 시기의 GSH량을 측정하고 또한 그 시기에 있어서의 전핵형성 능력 여부를 다수정유도방법으로 확인해 보고자 한다. 뿐만 아니라 GSH의 생합성 억제제인 L-buthionine S,R-sulfoximine (L-BSO)을 처리함으로써 난자의 성숙과정에 있어서 GSH의 합성시기를 알아보고자 하였다 (Fig. 1).

재료 및 방법

1. 난자의 획득

본 실험에 사용한 생쥐 (ICR strain)는 한양대학교 생물학과에서 사육한 생후 3주된 건강한 암컷으로 매일 낮 14시간 밤 10시간이 되도록 빛을 조절하고 물과 먹이를 충분히 제공하여 사육하였다. 암컷의 복강 내에 pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG, Sigma) 5 UI를 주사한 후 44~46시간에 경추 파괴로 세척된 난소는 해부현미경 (Wild, M5) 시야에서 예리한 바늘로 난포를 터뜨려 정상적인 난자를 수확하였다. GVBD, MI, MII시기의 난자는 GV시기에서 동일한 방법으로 수확하여 배양기 (37°C, 5% CO² in air)에서 5시간, 10시간, 18~20시간 배양 후 수확하였다. GVBD, MI시기의 난자를 얻기 위한 난자의 배양시간은 배양 후 lacmoid염색으로 염색체를 확인하였으며, MII시기의 난자는 제 1극체를 확인하여 수확하였다. 또한 *in vivo* 상태의 MII시기의 난자는 암컷의 복강 내에 pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG, Sigma) 5 UI를 주사하여 과배란을 유도하고 hCG주사 후 15~17시간에 경추 파괴로 도살한 후 수란관을 적출하여 배양액 내로 옮겨 예리한 바늘로 수란관을 찢어 난자-난구복합체 (oocyst-cumulus complex, OCC)를 수확하였다.

수확한 난자는 0.1% (w/v) hyaluronidase (Sigma)를 포함한 배양액 내로 옮겨 난구세포를 분리하였다. 난구세포의 분리는 해부현미경 하에서 판정하였으며, 세포질이 검게 나타나거나 fragment된 난자는 제거하였다. 처리된 난자는 5 mg/ml HEPES (adjusted pH 7.3~7.5), 1 mg/ml의 bovine serum albumin (BSA, Sigma), 20 µg/ml의 kanamycin이 첨가된 Ca^{++} - Mg^{++} -free Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 옮겨 수확하였다. 옮겨진 난자를 100~150개씩 분리하고 미세하게 뽑은 pasteur pipette으로 용액의 양을 5~6 µl 정도로 제거한 후 냉동실 (-20°C)에서 1~3시간 동안 얼렸다.

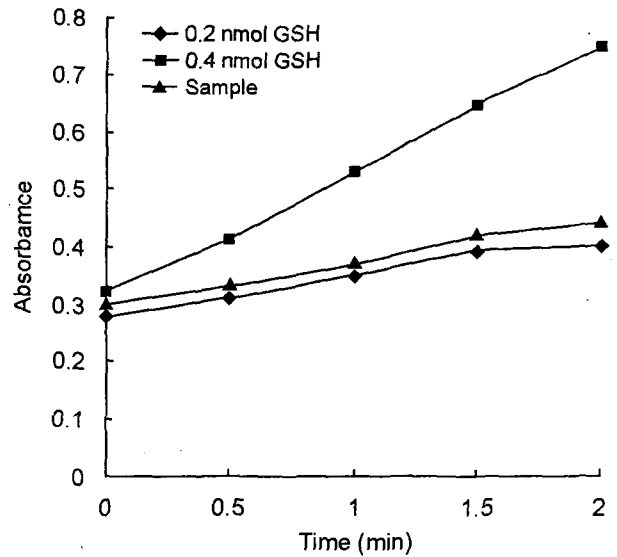


Fig. 2. Kinetics of microassay of mouse oocyte GSH. Approximately linear increase in absorbance was observed in standards and oocyte $\Delta A/\text{min}$ in sample $\div \Delta A/\text{min}$ per nmol GSH.

얻어진 난자를 해빙 후 0.625 M metaphosphoric acid로 희석하였다. 이 때 전체량이 50 µl가 되도록 하고 그 혼합액을 가늘게 뽑은 pasteur pipette으로 섞어 주었다. 난자의 과염여부는 해부현미경 하에서 확인하였으며 시료를 Ependorf tube (1.5 ml)에 넣은 후 이를 녹여서 15,000 g로 30초간 원심분리하였다. 원심분리한 후 상등액 (약 50 µl)을 가늘게 뽑은 pasteur pipette으로 5×60 mm siliconized glass tube에 옮기고 50 µl의 증류수를 넣어 1회 세척한 후 그 세척액을 채취된 상등액과 합하였다.

2. GSH의 정량

난자 내의 GSH정량은 효소학적 정량방법을 이용하여 GSH 뿐만 아니라 GSSH와 그 산화물까지를 포함한 총 Glutathione량을 정량하였다. 난자 내의 GSSH의 양은 세포질 내의 GSSH량을 GSH의 농도에 비교하였을 때 그 정도가 무의미하다는 보고에 기초하여 의미가 없다고 판정하였다. 정량반응액은 다음과 같이 준비하였다. 준비되어 있는 시료에 1.0~1.5 IU/ml glutathione reductase (type III, Sigma), 0.6 µmol/ml의 5,5'-dithiobis (nitrobenzoic acid)를 0.2 sodium phosphate -0.001 M sodium EDTA (pH 7.4~7.5)에 녹인 후 이를 37°C에서 잘 섞은 뒤에 0.04 µmol의 NADPH를 혼합하여 준 직후에 처음의 측정치를 제외하고 4회에 걸친 흡광계수의 증가를 관찰하였다 (Fig. 2).

3. Polyspermy의 유도

난자 내로의 정자의 관입을 증가시키기 위해서 수확되어진

Table 1. GSH levels at various stage of maturation in mouse oocytes cultured with or without L-BSO *in vitro*

Treatment	Stage of oocytes				
	GV	GVBD	MI	MII	Ovulated
-	0.100±0.014	0.135±0.016	0.153±0.005	0.218±0.014	0.222±0.014
+	-	0.008±0.001	0.009±0.001	0.008±0.001	

These data represented as mean (nmol/100 oocytes) ± SEM, n=5

난자의 투명대를 제거하였다. 투명대의 제거는 0.5% pronase (Sigma)를 37°C에서 1분간 처리하였다. 한편 정자를 수확하기 위해 생쥐를 경추파괴로 도살한 후 부정소를 적출하여 배양액 (BWW, Biggers *et al.*, 1971) 내에서 세척하여 혈액을 제거하였다. 세척된 부정소에 핀셋으로 눌러서 압력을 가하여 정자를 수확하였다. 이 정자의 현탁액을 상온에서 10분간 원심분리 (300 g, Minifuge GL, Heraeus Christ)하여 상층액을 제거하고, 남은 정자를 배양액으로 재현탁시킨 후 위와 동일하게 반복 세척하였다. 2회 반복하여 세척된 정자를 배양기 내에서 90분간 배양하여 수정능력획득을 유도하였다. 90분간 전배양한 정자액의 상층부의 1 ml을 pasteur pipette로 수확하여 Makler counting chamber에 옮겨 정자의 밀도와 운동성을 검정하여 운동성을 갖는 정자가 1.0×10^5 sperm/ml이 되도록 현탁액 내 정자의 밀도를 조정하였다. 적정농도로 준비된 정자의 현탁액 50 μ l를 배양접시 (Falcon, 60×15 mm)에 정치한 후 Brinster (1963)의 방법으로 멸균된 파라핀 (Waco, Japan)을 덮고 1방울 당 20개의 난자를 넣어 배양기 (37°C, 5% CO₂ + 95% air)에서 4~5시간 polyspermy를 유도하였다.

정자와 난자의 결합을 유도한 뒤 고정액 (1 acetic acid/3 ethanol, v/v)으로 옮겨 3시간 이상 고정시킨 후 watch glass 안에서 고정액과 lacmoid염색액을 1:3의 비율로 섞어준 염색용액에서 수분간 염색하였다. 염색된 난자는 광학현미경 (Olympus, CHB)하에서 관입되어진 정자의 핵과 그 탈응축 정도를 판정하였다.

4. GSH정량과 탈응축 판정

GSH의 생쥐난자의 성숙정도에 따른 합성시기를 알아보기 위하여 생합성 억제제인 L-buthionine-S,R-sulfoximine (L-BSO) 0.1 mM을 기본배양액에 녹여 처리하였다. 각 성숙시기의 결정 및 정량 그리고 탈응축 정도 판정은 위의 방법들과 동일하게 시행하였다. 통계적 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며 $P < 0.05$ 인 경우를 유의하다고 보았다.

결 과

1. 난자의 성숙정도와 전핵형성

정상군과 L-BSO처리군에서 정자핵의 탈응축과 전핵형성

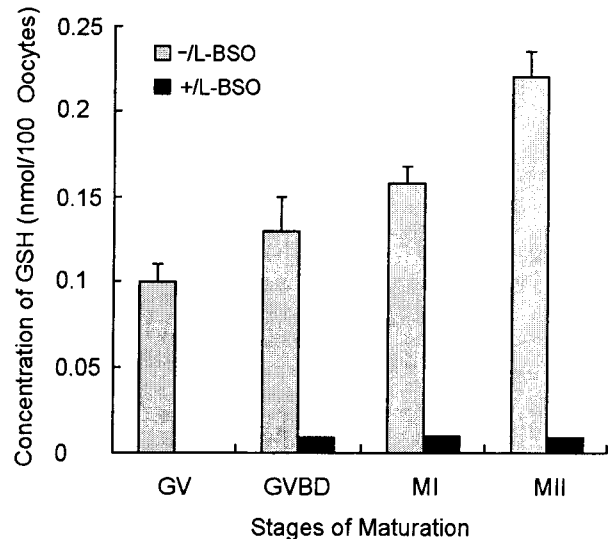


Fig. 3. The changes of GSH levels at various stages of maturation in mouse oocytes cultured in BWW with or without 0.1 mmol L-BSO *in vitro*. Values are mean ± SEM, n=5. *: $P < 0.001$.

여부는 다음과 같았다. 미성숙 난자 (GV)에 정자의 관입은 일어나지만 탈응축과 전핵형성은 일어나지 않았다. 성숙중인 난자 (GVBD, MI)에서는 부분적인 탈응축이 일어났으나 전핵은 형성하지 못하였다. *In vitro*에서 20시간 배양 후 성숙한 난자 (MII)와 과배란을 유도하여 얻은 난자 (Ovulated)에서는 정상적으로 탈응축과 전핵을 형성하였다. 그러나 위와 같은 모든 시기의 난자에 L-BSO를 처리한 경우 정자의 관입은 일어났으나 탈응축과 전핵형성은 일어나지 않았다.

2. 난자의 성숙정도와 Glutathione량

본 실험에서 성숙정도에 따른 난자내 GSH의 정량값은 다음과 같았다 (Table 1). 미성숙 난자 (GV), GVBD, MI, MII, 그리고 Ovulated에서는 난자당 각각 1.00 pmol, 1.35 pmol, 2.18 pmol, 2.22 pmol와 같이 검출되었는데 성숙시기를 거치면서 단계적으로 점차 증가하였다 (Fig. 3).

한편, L-BSO를 처리한 모든 실험군에서의 검출량은 난자당 0.08~0.09 pmol로 아주 적게 검출되었으며, 성숙시기에 따른 유의한 차이는 없었다 (Fig. 3). 정상군의 GSH검출량 비하여

L-BSO를 처리한 군의 GSH량은 크게 유의하게 ($P<0.001$) 감소되었다.

고 찰

포유류 정자핵은 정소에서 부정소를 거치는 동안 protamine 내 sulfhydryl의 산화작용으로 인하여 정자핵 내 많은 수의 disulfide bond를 유발시킴으로 응축되어 안정화되게 된다. 이러한 특성을 가진 정자핵이 난자의 세포질 내로 관입되면서 매우 빠른 속도로 그 염색질들이 탈응축 된다고 보고되었다^{3,4,9}. 그러나 아직도 이러한 현상에 대한 기작을 충분히 이해하지 못하고 있다.

이러한 기작을 밝히기 위하여 다양한 방법들을 탈응축 시키고, 정자 내의 염색체와 그 핵단백질을 분리 동정하는데 이용되었다. Sodium dodecyl sulfate (SDS, an anionic surfactant)와 dithiothreitol (DTT, a reagent which specially cleaves disulfide linkage)은 체외에서 정자핵의 안정화가 disulfide bond수와 관련된다는 사실을 밝히는데 이용되었으며, 이러한 연구는 포유류 정자핵 내에는 다수의 disulfide bond가 존재하고 있음을 밝힌 Bedford와 Calvin^{3,5}에 의해서 시작되었다.

세포내 환원력은 일반적으로 GSH (reduced glutathione)에 의해서 유지되어진다. 이는 GSH가 정자핵의 탈응축뿐만 아니라 protamine의 disulfide bond들의 환원에도 적극적으로 관여하며, disulfide bond를 끊어주는 sulfhydryl효소의 활성화에도 작용한다는 것이다¹⁸. 이러한 가설들은 핵내 disulfide bond의 환원이 정자핵의 탈응축에 관여한다는 계속적인 체외 연구들에 의해서 뒷받침 되어졌다¹².

본 실험에서 난자의 성숙시기에 따른 탈응축과 전핵형성을 시킬 수 있는 능력을 알아보기 위해서 성숙시기에 따라 다수 정을 유도한 결과 L-BSO를 처리하지 않은 정상군에서 미성숙 난자 (GV)에서는 관입만이 일어났으며, 탈응축과 전핵형성은 관찰할 수 없었다. 이는 핵막을 가지고 있는 미성숙 난자는 정핵을 탈응축 시키지 못한다는 보고^{26,28}와 일치하였다. 반면, 성숙중인 난자 (GVBD, MI)의 경우에는 성숙중인 난자에서 미성숙 난자에 반하여 관입된 정자핵이 부분적으로 탈응축이 일어난 것은 정자핵을 탈응축 시킬 수 있는 능력이 난자의 성숙정도에 의존한다는 보고^{7,34}와 일치하며, 난자의 성숙 및 세포질의 활성화와 깊은 관련이 있다는 보고^{2,10,16} 그리고 난자가 성숙과정에서 여러 가지 형태적, 생화학적 및 생리적인 변화를 거치는데 이러한 변화가 난자의 성숙과 수정 및 배아의 발생을 조절한다는 보고^{22,23}와도 일치하는 것으로 사료된다. 한편, 20시간 배양하여 성숙시킨 난자와 과배란 시켜 얻은 Ovulated 난자에서는 탈응축과정과 전핵형성이 정상적으로 일어났다. 반면에 L-BSO를 처리한 실험군에서는 모두가 탈응축과 정자핵의 탈응축과 전핵형성은 난자와 성숙정도에 밀접

한 관계가 있으며, 특히 성숙과정에서 glutathione의 합성과 축적에 깊은 관련이 있는 것으로 사료된다.

한편, 난자의 성숙시기에 따라서 측정된 glutathione의 양은 미성숙 난자에서 1.0 pmol, 성숙난자에는 2.2 pmol로 난자의 성숙정도에 따라 점증하는 것으로 나타났다 (Table 1, Fig. 1). 또한 *in vitro*에서 성숙시킨 난자와 *in vivo*에서 성숙한 난자 간에는 양적 차이가 없었다 (Table 1, Fig. 1). 이는 핵성숙과 일치하는 세포질 성숙 중의 세포질 내의 변화의 일면이라 사료된다. 한편 GV상태의 난자는 정자를 탈응축 시키지 못한다는 보고^{1,8,9}에서와 같이 이 시기의 난자는 glutathione환원력이 낮은 상태임을 시사해 주고 있는 것이다. GVBD를 거치며, 즉 세포질 성숙이 이루어지는 시기부터 양적 증가와 함께 그 환원력이 증가되는 것은 탈응축기작을 이해하는데 중요한 열쇠가 될 수 있을 것이다.

난자의 투명대를 제거한 후 다정자수정을 유도하였을 때 미성숙 난자에서 관입은 일어났으나, 탈응축이 일어나지 못한 것 역시 난자의 환원력이 낮기 때문이며, 이는 성숙개시 난자세포질의 활성화에 의해 조절됨을 뜻하는 것이다. GVBD 이후의 난자가 활성화되고, 탈응축이 일어나는 현상 역시 그와 같은 세포질 성숙도와 연관지어 생각할 수 있다. Glutathione의 생합성을 저해하는 L-BSO처리에 그 활성도가 약해지는 것도 마찬가지라고 사료된다.

결론적으로 난자세포질 내에서의 정자핵의 탈응축 현상은 glutathione의 환원에 의해 핵 내의 disulfide bond가 끊어지는 현상이며, 탈응축능력은 난자의 핵 성숙과 더불어 성숙과도 밀접한 관계가 있으며 glutathione의 합성 및 축적은 세포질 성숙의 중요한 요소중의 하나이며, 합성시기는 GVBD가 일어난 후부터라고 사료된다. Glutathione의 생합성저해제인 L-BSO를 처리하여 20시간 배양 성숙시킨 난자에서 낮은 glutathione의 양과 정자핵의 탈응축이 일어나지 못했다는 사실은 glutathione이 탈응축 시키는데 필수적 요소임을 나타내는 증거라고 사료된다. 하지만 난자내 정자핵의 탈응축에 관여하는 glutathione외의 여러 가지 요인들에 대한 계속적인 연구가 탈응축 기작을 밝히는데 필요하다.

참 고 문 헌

- 1) Angerer LM, Deleon DV, Angerer RC, Showman RM, Well DE and Raff RA (1984): Delayed accumulation of maternal histone mRNA during sea urchin oogenesis. *Devel Biol*, **101**: 477-484.
- 2) Balakier H and Tarkowski AK (1980): The role of germinal vesicle karyoplasm in the development of male pronucleus in the mouse. *Exp Cell Res*, **128**: 79-85.
- 3) Bedford JM (1972): An electron microscopic study of sperm

- penetration into the rabbit egg after natural mating. *Anat*, **133**: 213-254.
- 4) Clarke HJ and Masui Y (1983): The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. *Devel Biol*, **97**: 291-301.
 - 5) Calvin HI, Grosshans K and Blake EJ (1986): Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res*, **14**: 265-275.
 - 6) Clarke HJ and Masui Y (1985): Inhibition by dibutyryl cyclic AMP of the transition to metaphase of mouse oocyte nuclei and its reversal by cell fusion to metaphase oocyte. *Devel Biol*, **108**: 32-37.
 - 7) Clarke HJ and Masui Y (1986): Transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in the cytoplasm of maturing oocytes of the mouse. *J Cell Biol*, **102**: 1039-1046.
 - 8) Dean J (1983): Decondensation of mouse sperm chromatin and reassembly into nucleosomes mediated by polyglutamic acid *in vitro*. *Devel Biol*, **99**: 210-216.
 - 9) Green GR and Poccia DL (1985): Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation. *Devel Biol*, **108**: 235-245.
 - 10) Hashimoto N and Kishimoto T (1988): Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation. *Devel Biol*, **126**: 242-252.
 - 11) Kline D (1988): Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Devel Biol*, **126**: 346-361.
 - 12) Li L, Seddon AP, Meister A and Risley MS (1989): Spermatogenic cell interaction are required for maintenance of spermatogenic cell glutathion. *Biol Reprod*, **40**: 317-331.
 - 13) Lohka MJ and Masui Y (1983): The germinal vesicle material required for sperm pronuclear formation is located in the soluble fraction of egg cytoplasm. *Exp Cell Res*, **148**: 481-491.
 - 14) Lohka MJ and Masui Y (1983): Formation *in vitro* of sperm pronuclei and meiotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science*, **220**: 719-721.
 - 15) Lohka MJ and Masui Y (1984): Roles of cytosol and cytoplasmic particles in nuclear envelope assembly and sperm pronuclear formation in cell-free preparations from amphibian eggs. *J Cell Biol*, **98**: 1222-1230.
 - 16) Lohka MJ and Masui Y (1984): Effects of Ca⁺⁺ ions on the formation of metaphase chromosomes and sperm pronuclei in cell-free preparations from unactivated rana pipens eggs. *Devel Biol*, **103**: 434-442.
 - 17) Lohka MJ and Maller D (1985): Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts. *J Cell Biol*, **101**: 518-523.
 - 18) Maih GA and Yanagimachi R (1975): Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa *in vitro*. *J Reprod Fert*, **44**: 293-296.
 - 19) Maro B, Johnson MH, Webb M and Flach G (1986): Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morph*, **92**: 11-32.
 - 20) Marushige Y and Marushige K (1978): Dispersion of mammalian spermchromatin during fertilization: an *in vitro* study. *Biochim Biophys Acta*, **519**: 1-22.
 - 21) Mayer JF JR, Chang TSK and Zirkin BR (1981): Spermatogenesis in the mouse 2. amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatids and spermatozoa. *Biol Reprod*, **25**: 1041-1051.
 - 22) Meister A and Anderson ME (1983): *Glutathione Ann Rev Biochem*, **52**: 711-760.
 - 23) Niwa K and Chang MC (1975): Fertilization of rat eggs *in vitro* at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes maturation and early embryonic development in the mouse. *Devel Biol*, **129**: 304-344.
 - 24) Perreault SD and Zirkin BR (1982): Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase *in vitro*. *J Exp Zool*, **224**: 253-257.
 - 25) Perreault SD, Wolff RA and Zirkin BR (1984): The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation *in vitro*. *Devel Biol*, **101**: 160-167.
 - 26) Perreault SD, Barbee RR and Slott VL (1988): Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Devel Biol*, **125**: 181-186.
 - 27) Reyes R, Rosado A, Hernandez O and Elgado NM (1989): Heparin and glutathione: physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res*, **23**: 39-47.
 - 28) Rodriguez H, Ohanian C and Bustos-Obregon E (1985): Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa *in vitro*: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int J Androl*, **8**: 147-158.
 - 29) Tesarik J and Opecny V (1989): Developmental control of

- the human male pronucleus by ooplasmic factors. *Biol Reprod*, **4**: 962-968.
- 30) Tesarik J and Kopečný V (1989): Developmental control of the human male pronucleus by ooplasmic factors. *Biol Reprod*, **4**: 962-968.
- 31) Tesarik J and Kopečný V (1989): Developmental control of the human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res*, **24**: 135-149.
- 32) Slott VL and Hales BF (1987): Effect of glutathione depletion by buthionine sulfoximine on rat embryonic development *in vitro*. *Biochem Pharm*, **36**: 683-688.
- 33) Witkowska A (1981): Ponuclear development and the first cleavage division in polyspermic mouse eggs. *J Reprod Fert*, **62**: 493-498.
- 34) Xu KP and Greve T (1988): A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fert*, **82**: 127-134.
- 35) Zirkin BR, Soucár DA, Chang TSK and Perreault SD (1985): *In vitro* and *in vivo* studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Res*, **11**: 349-365.
-