

동결 보존에 의한 돼지 정자 세포질 칼슘 신호의 변화

이선우[†] · 이옥화[†] · 김준철 · 명평근 · 박창식* · 우선희[#]

충남대학교 약학대학, *충남대학교 동물자원학부 형질전환 복제돼지 연구센터

(Received November 26, 2006; Revised December 5, 2006)

Alteration of Cytosolic Ca²⁺ Signal by Cryopreservation in Pig Sperm

Sunwoo Lee[†], Yuhua Li[†], Joon-Chul Kim, Pyung-Keun Myung, Chang-Sik Park* and Sun-Hee Woo[#]

College of Pharmacy, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

*Division of Animal Science and Resources, Research Center for Transgenic Cloned Pigs,

Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — Although mammalian sperms are cryopreserved for *in vitro* fertilization a process of cryopreservation decreases the fertility. Acrosome reaction requires depolarization-induced Ca²⁺ influx and Ca²⁺ releases from the Ca²⁺ stores. To examine whether the cellular Ca²⁺ mobilization is altered by a sperm cryopreservation we compared cytosolic Ca²⁺ signals between fresh and cryopreserved pig sperms using confocal Ca²⁺ imaging. The magnitudes of depolarization-induced Ca²⁺ increases were significantly smaller in cryopreserved sperms. Exposures to 10 mM caffeine or 5 μM thapsigargin elicited less Ca²⁺ increases in the cryopreserved sperms compared to fresh sperms. In addition, progesterone-triggered Ca²⁺ rises, that are thought to enhance acrosome reaction, were completely abolished in the cryopreserved sperms. These results suggest that storage and/or release of Ca²⁺ from the intracellular Ca²⁺ stores in pig sperms are significantly impaired by the process of cryopreservation.

Keywords □ pig sperm, cryopreservation, cytosolic Ca²⁺

포유동물의 정자는 인공 수정을 위해 동결 보존되며, 동결 보존된 정자는 정상 정자에 비해 수정력이 낮다.¹⁾ 동결 보존된 정자가 수정력이 낮은 것은 동결에 의해 정자의 운동성과 생존력이 저하되기 때문이라고 여겨지고 있다.²⁻⁴⁾ 정자를 동결 해동하는 과정에 발생하는 세포막의 손상은 정자의 첨체반응(acrosome reaction) 또한 저하시킨다.⁵⁾ 동결과정 시에는 급격한 온도 변화에 의해 세포막의 구조가 변형되고, 사용된 동결 보조제의 막 투과로 세포의 부피 및 삼투압이 변할 수 있다.²⁻⁴⁾ 이러한 변화는 다양한 세포성분에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 정자의 세포질 Ca²⁺ 신호는 정자의 운동성 및 첨체 반응 조절에 결정적인 역할을 한다.⁶⁻¹⁰⁾ 첨체 반응 시에는 정자 내의 Ca²⁺ 양이 증가하는데,

이는 세포막을 경유한 Ca²⁺ 유입(entry)과⁸⁾ 세포 내 Ca²⁺ 저장고로부터의 Ca²⁺ 유리(release)^{9,10)}의 협동 과정으로 일어난다. 첨체 반응은 특히 여성 호르몬 프로게스테론(progesterone)에 의해 조절된다고 알려져 있다.^{11,12)}

돼지의 경우 인간을 비롯한 다른 포유동물에 비해 인공 수정 성공률이 현저히 낮고, 수정 시 다정자가 난자로 침입하는 확률이 다른 종에 비하여 월등히 높다고 알려져 있다.¹³⁾ 이러한 선행 보고들로 미루어 돼지의 첨체 반응이 다른 종과 일부 다를 가능성도 배재할 수 없다. 첨체 반응 시의 Ca²⁺ 신호화 과정이 돼지의 정자에서 어떻게 다룰지에 대하여는 아직 알려지지 않았으며, 이는 다른 포유류와 다를 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 동결 보존 과정이 돼지 정자의 Ca²⁺ 신호에 대해 미치는 효과를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 정상 및 동결 보존된 단일 돼지 정자에 첨체 반응을 일으킬 수 있는 조작을 인위적으로 가하고, 이 때 발생하는 정자 세포내 Ca²⁺의 변화를 실시간 공초점 Ca²⁺ 영상화(confocal Ca²⁺ imaging) 기법으로 비교 관찰하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5924 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) shwoo@cnu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this study.

실험 방법

정자의 동결 및 해동

돼지(Duroc) 정자는 Beltsville straw 동결법으로 동결하였다.¹⁴⁾ 간략히, 정액을 1:4 Beltsville Thawing 용액(20.53 mM glucose, 2.04 mM sodium citrate, 1.49 mM sodium bicarbonate, 0.43 mM EDTA, 1 mM KCl)으로 씻어낸 후, 정자의 개수를 세고, 침체를 검사하였다. 가라앉은 정자들을 LEN 용액(11% α -lactose, 0.05% N-acetyl-D-glucosamine, 20% egg yolk)으로 희석하여 1.0×10^9 sperms/ml이 되도록 한 후, 4°C 냉장고에 2시간 냉각시켰다. 다시 두 번째 희석액(11% α -lactose, 20% egg yolk, 1% Orvus ES paste(OEP), 4% glycerol)으로 희석한 후, 5 ml을 취하여 빨대에 채우고 4°C 냉장고에 1시간 정도 보관하였다. 정자가 든 빨대는 액체 질소 가스에 20분간 노출한 후, 액체 질소에 넣어서 냉각하였다.

동결 돼지 정자의 농도는 평균 4×10^8 sperms/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 μ g/ml gentamycin, 2 mg/ml polyvinyl-alcohol, pH 7.4)으로 옮긴 후, 1,500 rpm으로 원심 분리를 하여 상층액을 버리고, 정자 층만을 다시 IL-PVA 용액으로 3회 세척하였다.

정자의 수정능 획득

신선하게 사출된 돼지(Duroc) 정액은 수정능 획득(capacitation) 전에 37°C 항온기에 계속 보관하였다. 돼지 정자의 농도는 평균 4×10^8 sperms/ml이었다. 보관된 정자의 수정능 획득을 위하여, 정자를 capacitation 용액(5 mg/ml bovine serum albumin (Sigma), 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 15 mM NaHCO₃, pH 7.4)에서 1시간 동안 37°C에서 보관하였다. 동결된 돼지 정자는 해동 및 세척 후 동일한 수정능 획득과정을 거쳤다.

Confocal Ca²⁺ imaging

수정능 획득 후 정자를 실온에서 1시간 동안 Ca²⁺ 형광 지시약인 fluo-4 AM(5 μ M; Molecular Probes Inc.)으로 loading 하였고, 동시에 세포를 poly-L-lysine(0.01%)로 코팅된 커버글라스에 부착시켰다. 형광 지시약의 농도 및 loading 시간은 실험에 사용된 현미경의 100배 대물렌즈에서 Ca²⁺ 신호의 변화가 뚜렷이 나타나기 위한 조건이다. 그 후 단일 정세포 내 세포질 Ca²⁺ 농도 변화를 도립 현미경(inverted LEICA DM IRBE)에 연결된

공초점 영상화(laser scanning confocal imaging) 시스템(Leica TCS SP, Germany)으로 측정하였다. Fluo-4는 488 nm의 레이저(Ar/Kr ion laser, Omnichrome) 빔으로 excitation 시켰고, 510 nm 이상의 형광을 100배 대물렌즈(oil immersion, NA, 1.3)로 모아 영상화하였다. 세포는 계속 37°C로 가온된 Tyrode 용액(135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 15 mM NaHCO₃, pH 7.4)으로 계속 superfusion 하였다. 2-D 영상은 Workstation TCS NT 프로그램(Leica)로 기록하였다. 각 약물의 처리는 자체 제작한 고속 용액교환 장치를 이용하여 단일 세포를 대상으로 시행하였다.

데이터 분석

2-D 영상은 TCS Lite PC 프로그램(Leica)로 분석하였다. 측정된 fluo-4-Ca²⁺ 형광의 비(F/F₀)는 Ca²⁺ 농도를 나타내며, Ca²⁺ 농도의 변화는 정자 head(두부) 전체에서 측정하였다. F₀는 평균 휴지기 형광 광도(average resting fluorescence intensity)를, F는 형광 광도를 각각 나타낸다. 실험 데이터는 평균±표준오차로 표시하였으며, "n"은 실험에 사용된 세포의 수를 나타낸다. 통계적 유의성은 paired Student's *t* test를 사용하여 검증하였고, *P*<0.05인 경우에 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주하였다.

실험 결과 및 고찰

동결보존에 의한 전압 의존성 Ca²⁺ 증가의 변화

성공적으로 침체 반응이 일어날 때에는 정자 세포막의 전압이 탈분극 된다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 인간 정자의 탈분극 시에는 세포막의 전압의존성 Ca²⁺ 채널이 열리며 외부의 Ca²⁺이 내부로 유입되고, 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가한다.^{8,15)} 탈분극 시의 Ca²⁺ 변화를 관찰하기 위하여 세포 외부용액에 고농도의 K⁺(40 mM)을 첨가하여 단일 정자에 일시적으로 처리하였다.

정상(fresh) 정자의 경우 K⁺ 처리 후 정자 두부의 Ca²⁺ 농도([Ca²⁺]_i)가 두 단계의 속도로 현저히 증가하였다(Fig. 1A, 1B; left panels). [Ca²⁺]_i(F/F₀)는 K⁺에 의하여 약 12.8초 후에 최대값에 도달하였고, 그 형광 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.52로 측정되었다. K⁺을 처리한 후 약 6.4초 동안은 $\Delta F/F_0$ 이 다소 적었으나(0.11), 두 번째 단계에서는(>6.4초) 보다 급격한 농도 변화($\Delta F/F_0$ =0.41)를 보였다. 대조적으로, 동결보존 했던 정자에서는 K⁺에 의한 [Ca²⁺]_i의 증가폭이 현저히 낮게 나타났다(Fig. 1A, 1B; right panels). K⁺ 처리 후 약 35.3초에 [Ca²⁺]_i 수치가 최대($\Delta F/F_0$ =0.1)에 도달하여서, 그 증가 속도도 낮음을 알 수 있었다. 최대값에 도달한 후, [Ca²⁺]_i는 다시 지속적으로 감소하여 K⁺ 처리 전 농도보다 오히려 현저히 낮아졌다. 48개의 정상 정자 및 10개의 동결 정자에서 K⁺을 처리하여 얻은 Ca²⁺ 농도의 평균 변화량을 비교해 보았을 때, 동결한 정자에서 약 65% 감소한 것을 알 수

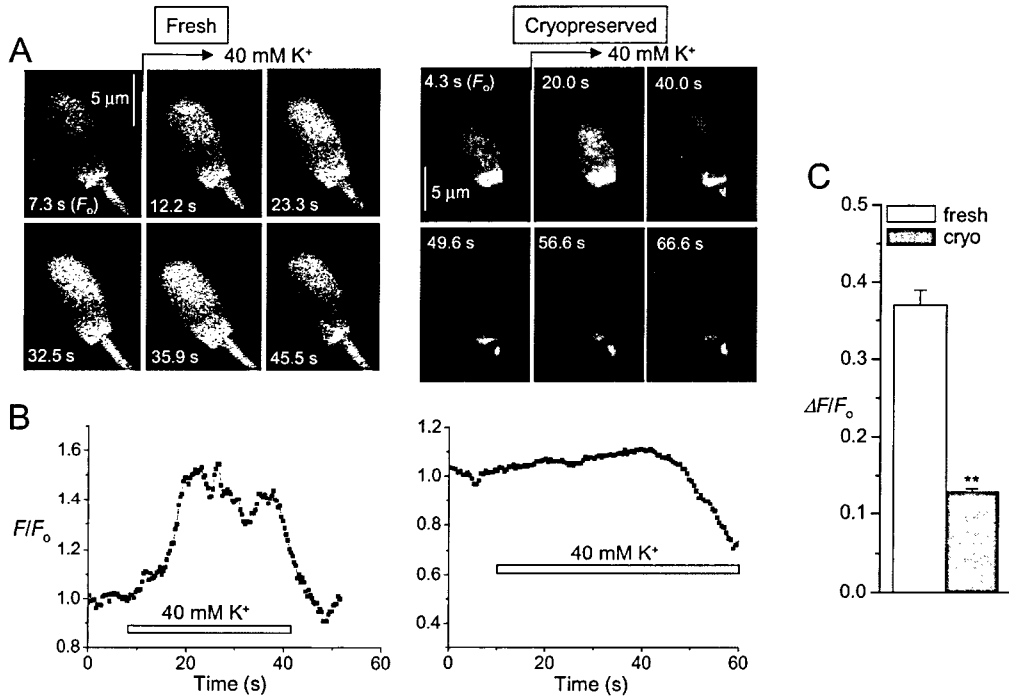


Fig. 1 – Effect of high K⁺ on intracellular Ca²⁺ concentration in fresh and cryopreserved pig sperms. (A) Confocal Ca²⁺ images recorded at indicated time points in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. Ca²⁺ fluorescence was measured from the head region. (B) Time course of the effect of K⁺ on intracellular Ca²⁺ (F/F₀) in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. F/F₀ was measured from head region. (C) Comparison of the effects of 40 mM K⁺ on intracellular Ca²⁺ concentrations in fresh and cryopreserved sperms. ***P*<0.01 vs. fresh sperms.

있었다(Fig. 1C; *P*<0.01).

동결보존에 의한 caffeine-의존성 Ca²⁺ 증가의 변화

침체반응이 일어나기 위해서는 탈분극에 의한 Ca²⁺ 유입뿐만 아니라, 세포 내 Ca²⁺ 저장고로부터 Ca²⁺ 유리과정이 필수적이다.^{9,10} 정자의 Ca²⁺ 저장고(acrosome 이라 알려져 있음)에는 ryanodine receptor(RyR)와 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R)가 모두 존재한다고 알려져 있다.^{9,13} 또한 소의 경우 정자를 동결한 후 카페인(caffeine)에 의한 Ca²⁺ 유리 양상이 증가-감소를 반복하는 주기성을 갖게 된다는 보고도 있다.¹⁵ 다음 실험에서는 돼지의 정상 및 동결 정자에 RyR를 활성화시키는 카페인을 처리하여 소포체로부터 유리되는 Ca²⁺ 양을 측정하여 비교하였다.

정상 정자 내의 Ca²⁺ 농도는 카페인(10 mM; 최대 효과를 나타냄) 처리 후 현저한 증가를 보였다(Fig. 2A, 2B, left panels). 정자 두부 내의 Ca²⁺ 농도는 처리 후 18.1초 후에 최대값에 도달하였고, 그 변화량(ΔF/F₀)은 0.33이었다. 증가한 Ca²⁺에 의해 regenerative Ca²⁺ release가 종종 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B, left panel; Ca²⁺의 증가 감소가 오랜 시간 반복적으로 나타남). 동결보존한 정자에 같은 농도의 카페인을 처리하였을 경우, 정자 내 Ca²⁺ 농도 증가는 완전히 사라졌다(Fig. 2B, right panel). 오히려 카페인 처리 후 Ca²⁺ 농도가 휴지기 양보다 다소

감소하였다(Fig. 2B, 2C). 조사한 정상 정자(n=8) 및 동결 정자(n=14)들에서 관찰된 Ca²⁺ 변화량의 평균은 현저한 차이를 보였다(Fig. 2C; *P*<0.01). 결과가 관찰되어, 두 그룹간의 현저한 차이를 이는 카페인에 의한 형광지시약의 bleaching에 의한 가능성이 가장 크다. 본 실험 결과는 카페인-민감성 Ca²⁺ 저장고에 Ca²⁺이 고갈되었거나, RyR의 기능이 억제되었음을 나타낸다.

동결보존에 의한 thapsigargin-유도성 Ca²⁺ 증가의 변화

10 mM 카페인에 의해 증가된 세포질 Ca²⁺ 양으로 Ca²⁺ 저장고에 저장된 Ca²⁺ 양을 알 수 있으나, 카페인 민감성 저장고와 독립적으로 IP₃R를 갖고 있는 저장고가 존재할 가능성이 남아있다. 이러한 저장고에 보다 선택적으로 작용한다고 알려진 thapsigargin(Ca²⁺-pump의 억제제)을 정상 및 동결정자에 처리하여 그 효과를 비교하였다. 실제, 인간 혹은 소의 정상 정자에 thapsigargin을 처리하였을 때 세포내 Ca²⁺의 양은 현저히 증가된다고 보고된 바 있다.^{10,13,16} Thapsigargin은 Ca²⁺이 Ca²⁺ 저장고로 uptake되는 것을 억제함으로써 세포질에 Ca²⁺을 증가시키므로 이러한 Ca²⁺ 변화를 측정하였다.

5 μM thapsigargin을 처리하였을 때, 정상 정자 내의 Ca²⁺ 농도는 처리한지 3.2초 후에 최대값에 도달하였고, 그 변화량(ΔF/F₀)은 0.51이었다(Fig. 3A, 3B; left panels). Thapsigargin이 준

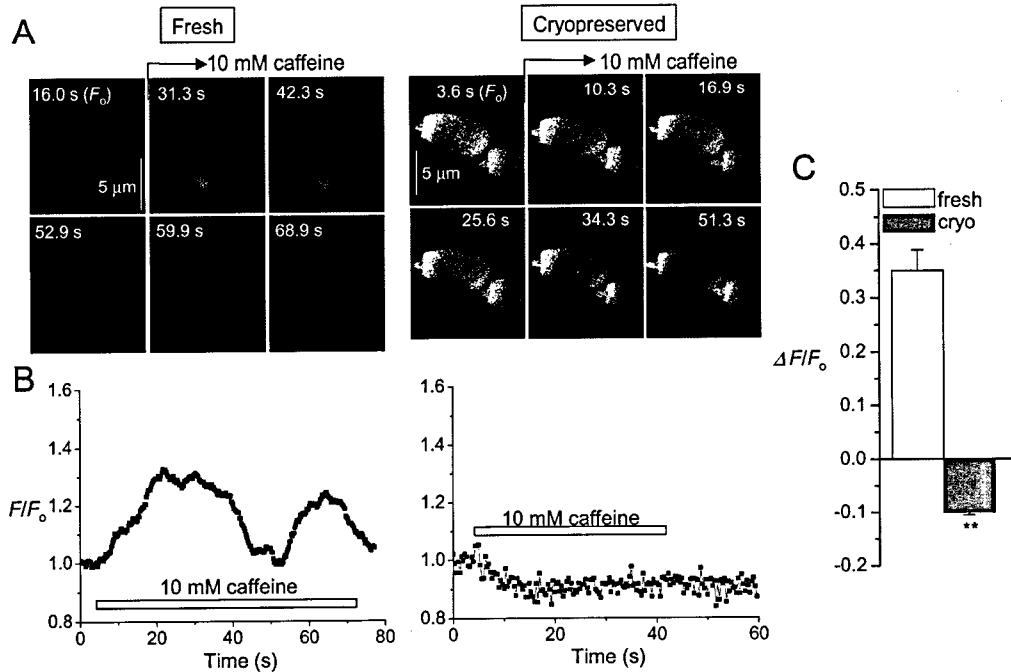


Fig. 2 – Effect of caffeine on intracellular Ca^{2+} concentration in fresh and cryopreserved pig sperms. (A) Confocal Ca^{2+} images recorded at indicated time points in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. Ca^{2+} fluorescence was measured from the head region. (B) Time course of the effect of caffeine on intracellular Ca^{2+} (F/F_0) in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. F/F_0 was measured from head region. (C) Comparisons of the effects of 10 mM caffeine on intracellular Ca^{2+} concentrations in fresh and cryopreserved sperms. ** $P < 0.01$ vs. fresh sperms.

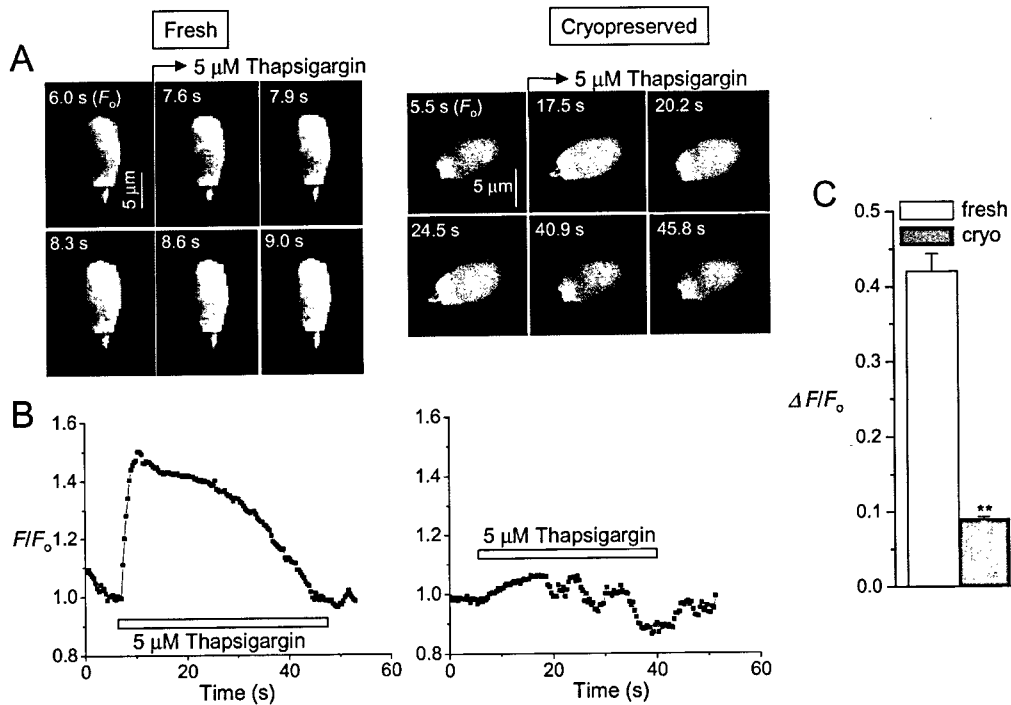


Fig. 3 – Effect of thapsigargin on intracellular Ca^{2+} concentration in fresh and cryopreserved pig sperms. (A) Confocal Ca^{2+} images recorded at indicated time points in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. Ca^{2+} fluorescence was measured from the head region. (B) Time course of the effect of thapsigargin on intracellular Ca^{2+} (F/F_0) in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. F/F_0 was measured from head region. (C) Comparisons of the effects of 5 μ M thapsigargin on intracellular Ca^{2+} concentrations in fresh and cryopreserved sperms. ** $P < 0.01$ vs. fresh sperms.

재합에도 불구하고 증가한 Ca²⁺은 다시 감소하였는데, 이는 세포막에 존재하는 다른 Ca²⁺ 수송체를 통해 외부로 Ca²⁺이 제거되기 때문으로 생각된다. 이와 대조적으로 동결하여 해동한 정자에서는 같은 농도의 thapsigargin을 처리하였을 때 Ca²⁺ 농도의 증가량($\Delta F/F_0$)이 현저히 낮았다(Fig. 3A, 3B; right panel; Fig. 3C). 특히 동결한 정자에서는 Ca²⁺의 증가가 오래 유지되지 않았고, 증가-감소의 주기가 반복되었다(Fig. 3B, right panel). Thapsigargin에 의해 증가한 평균 Ca²⁺ 양은 동결한 정자에서 약 80% 감소한 것으로 나타났다(Fresh, n=22; cryopreserved, n=6; $P<0.01$).

동결한 소의 정자의 경우, thapsigargin 처리에 의하여 여전히 세포질 Ca²⁺ 농도의 증가가 관찰된 바 있는데,¹⁵⁾ 이러한 보고는 우리가 동결한 돼지 정자에서 관찰한 결과와 다소 다르다(Fig. 3). 그러나 피낭류(ascidian)의 정자에서는 동결 후 thapsigargin에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도 증가 양이 정상 정자에 비해 낮다고 보고된 바 있다.¹⁷⁾ 이러한 다양한 결과들은 동결 과정 후 수정력이 좋에 따라 다른 사실을 설명해 줄 수 있을 것이다.

동결보존에 의한 프로게스테론 효과 변화

배란 시 난포액에서 유리되는 호르몬의 주된 성분인 프로게스테론은 정자에 작용하여 세포 내 Ca²⁺ 양을 증가시킨다.^{11,12)} 개

의 경우 정상 정자에 비해 동결되었던 정자에서 프로게스테론에 의한 세포질 Ca²⁺ 증가 정도가 현저히 낮다고 보고된 바 있다.¹⁸⁾ 그러나 인간의 정자는 동결한 후에도 프로게스테론에 의한 Ca²⁺ 농도 증가 정도에는 변화가 없다는 보고도 있다.⁸⁾ 100 μ M 프로게스테론을 돼지 정자에 처리하였을 때, 정상 정자 두부 내의 Ca²⁺ 농도는 처리 후 24.2초 후에 최대값에 도달하였고, 그 변화량($\Delta F/F_0$)은 0.87이었다. 최대값에 도달한 후 Ca²⁺ 농도는, 프로게스테론이 계속 존재하는 상태에서 23.5초간 완만한 감소를 나타내었고, 처리를 중단한 후부터 급격한 감소를 나타내었다(Fig. 4A, 4B). 두부 내의 Ca²⁺ 농도는 프로게스테론에 의해 두 단계로 증가되었다. 먼저 8.6초까지 완만한 증가($\Delta F/F_0=0.24$)를 나타낸 후, 다음 15.6초 동안 급격히 증가하였다($\Delta F/F_0=0.63$). 동결하였던 정자에 프로게스테론을 처리하였을 경우, Ca²⁺ 농도는 증가하지 않았고, 처리 후 지속적으로 감소하여, 12.2초 내에 최소값에 도달하였다(Fig. 4C, 4D). 감소한 $\Delta F/F_0$ 값은 0.20이었다. 여러 개의 정상 및 동결정자에서 이와 같은 현저한 반응 차이가 관찰되었다(Fig. 4C; fresh, n=5; cryopreserved, n=6; $P<0.01$).

결 론

본 실험결과는 돼지 정자에서 기존에 연구된 적이 없는 새로

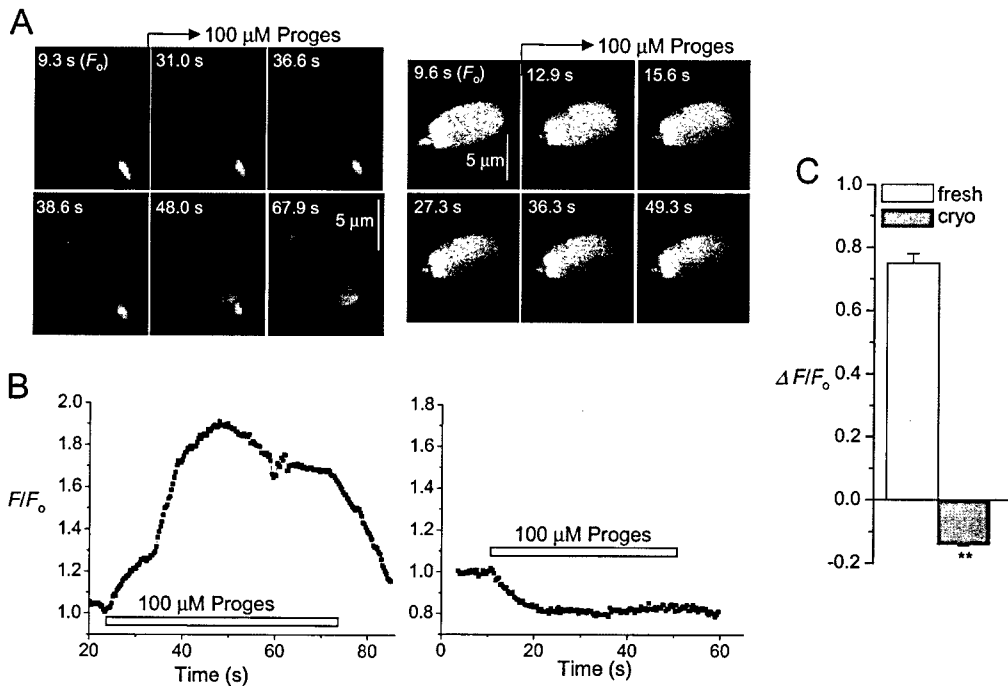


Fig. 4 – Effect of progesterone on intracellular Ca²⁺ concentration in fresh and cryopreserved pig sperms. (A) Confocal Ca²⁺ images recorded at indicated time points in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. Ca²⁺ fluorescence was measured from the head region. (B) Time course of the effect of progesterone on intracellular Ca²⁺ (F/F₀) in fresh (left) and cryopreserved (right) pig sperms. F/F₀ was measured from head region. (C) Comparisons of the effects of 100 μ M progesterone on intracellular Ca²⁺ concentrations in fresh and cryopreserved sperms. ** $P<0.01$ vs. fresh sperms.

운 결과로서, 동결 후 수정 성공률이 현저히 감소되는 현상을 부분적으로 설명할 수 있는 기전이 될 수 있다. 본 실험연구 결과들은 정자의 동결에 의하여 세포 내 Ca^{2+} 저장고로부터의 Ca^{2+} 유리 양과, 전압의존성 Ca^{2+} 채널을 통해 유입되는 Ca^{2+} 양이 저하됨을 나타낸다. 이러한 기능저하는 동결 후에 돼지 정자의 침체반응 발생 정도가 낮아 수정력이 저하되는 것에 대한 하나의 세포 기전이 될 수 있다. 뿐만 아니라, 프로게스테론에 의한 Ca^{2+} 증가과정에 대한 자세한 분자적 기전은 아직 명확히 알려지지 않았으나, 프로게스테론 신호전달과정에서 Ca^{2+} 신호의 전달 또한 동결에 의해 손상됨을 보여주었는데, 이러한 기능저하도 침체 반응 효율에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 동결과정이 어떠한 기전으로 세포 내의 원활한 Ca^{2+} 신호전달을 억제하는지에 대한 자세한 기전은 앞으로 연구가 되어야 할 부분이다. 동결 및 해동과정에서 막의 유동성 변화는 소포체 막 및 세포막 이온 수송체들을 경유한 이온의 이동에 현저한 변화를 가져 올 것이고, 세포내 Ca^{2+} 저장고에 저장되는 Ca^{2+} 양을 감소시킬 가능성이 있다. 해동 후 세포막 정상 단백질의 양의 저하도 하나의 기전이 될 것이다. 정자의 보존과 인공수정률의 개선을 위하여 적절한 정자 동결 방법의 개발, 저하된 Ca^{2+} 신호를 향진시킬 수 있는 적합한 약물의 발굴이 앞으로 진행되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(S.H. Woo, C.S. Park) 및 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-00000-0; C.S. Park)의 지원으로 수행되었음.

문 헌

- 1) Richter, M. A., Haning, R. V. Jr. and Shapiro, S. S. : Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. *Fertil. Steril.* **41**, 277 (1984).
- 2) Centola, G. M., Raubertas, R. F. and Mattox, J. H. : Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J. Androl.* **13**, 283 (1992).
- 3) Alvarez, J. G. and Storey, B. T. : Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J. Androl.* **14**, 199 (1993).
- 4) Agarwal, A., Tolentino, M. V. Jr., Sidhu, R. S., Ayzman, I., Lee, J. C., Thomas, A. J. Jr. and Shekarriz, M. : Effect of cryopreservation on semen quality in patients with testicular cancer. *Urology* **46**, 382 (1995).
- 5) McLaughlin, E. A., Ford, W. C. and Hull, M. G. : Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 71 (1993).
- 6) Lindemann, C. B. and Kanous, K. S. : Regulation of mammalian sperm motility. *Arch. Androl.* **23**, 1 (1989).
- 7) Garbers, D. L. : Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 719 (1989).
- 8) Linares-Hernandez, L., Guzman-Grenfell, A. M., Hicks-Gomez, J. J. and Gonzalez-Martinez, M. T. : Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1372**, 1 (1998).
- 9) Ho, H. C. and Suarez, S. S. : An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* **65**, 1606 (2001).
- 10) Rossato, M., Di Virgilio, F., Rizzuto, R., Galeazzi, C. and Foresta, C. : Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 119 (2001).
- 11) Garcia, M. A. and Meizel, S. : Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol. Reprod.* **60**, 102 (1999).
- 12) Harper, C. V., Kirkman-Brown, J. C., Barratt, C. L. and Publicover, S. J. : Encoding of progesterone stimulus intensity by intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in human spermatozoa. *Biochem. J.* **372**, 407 (2003).
- 13) Wang, W. H., Day, B. N. and Wu, G. M. : How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc. Res. Tech.* **61**, 335 (2003).
- 14) Park, C. S. and Yi, Y. J. : Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim. Reprod. Sci.* **73**, 53 (2002).
- 15) Gualtieri, R., Boni, R., Tosti, E., Zagami, M. and Talevi, R. : Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium *in vitro*. *Reproduction* **129**, 51 (2005).
- 16) Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L. and Graham, J. K. : *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* **51**, 461 (1999).
- 17) Yoshida, M., Ishikawa, M., Izumi, H., De Santis, R. and Morisawa, M. : Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 149 (2003).
- 18) Effect of cryo-injury on progesterone receptor(s) on canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology* **64**, 844 (2005).