

포유 동물 수정에서 정자 특이적 Phospholipase Czeta의 역할

차의과학대학교 강남차병원 여성의학연구소

윤 숙 영*

The Role of Phospholipase Czeta at Fertilization in Mammals

Sook-Young Yoon *

Fertility Center, CHA Gangnam Medical Center, CHA University

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(2): 81-88.]

서 론: 수정에서 Ca²⁺ 증감 현상

황체 호르몬 자극으로 충분히 자란 포유 동물 난자는 감수분열 특정 시기에 세포 분열이 멈춰있다가 정자에 의해 수정이 이루어지면, 피질 과립을 분비하여 여러 정자에 의한 다 수정이 방지되고, 멈춰있던 세포 주기가 다시 시작되면서 제 2극체를 방출하고, 전핵 (Pronucleus)을 형성하며, 배아 유전자 발현이 시작되면서 제 1차 난할에 들어간다.¹ 이러한 일련의 과정을 난자 활성화 (egg activation)이라고 한다. 난자 활성화는 정자가 난자 막과 융합함과 동시에 세포 내 Ca²⁺ 농도가 급격히 증가하면서 시작되는데, 이때, 난자가 정자와 수정되어도 난자 세포질에서 Ca²⁺의 증가가 없으면 난자의 활성이 일어나지 않는다. 즉, BAPTA와 같은 세포 내 Ca²⁺-chelator를 처리하여 세포질 내 Ca²⁺ 농도 증가를 억제하면, 정자에 의한 수정이 일어나도 Ca²⁺ 증가가 일어나지 않아 난자의 활성이 일어나지 않는다.² 반면, Ca²⁺-ionophore 등으로 세포질 내 Ca²⁺

의 농도를 순간적으로 증가시키면 정자 없이도 난자의 활성화가 이루어진다.³ 한편, 생쥐와 사람과 같은 포유 동물의 난자에서는 Ca²⁺ 농도가 일시적으로 증가하였다가 다시 급격히 감소하는 현상이 반복적으로 일어나는데 이를 Ca²⁺ 증감 현상 (oscillation)이라고 한다. Ca²⁺ 증감 현상의 증가되었던 Ca²⁺이 감소되었다가 다시 증가되기까지의 빈번도 (frequency)는 2분 간격에서 30분 간격으로 동물의 종에 따라 다르게 나타나며, 생쥐의 경우 20분마다 증가 현상이 나타난다^{2,3}. 또한 생쥐 난자의 Ca²⁺ 증감 현상은 수정 직후로부터 수시간 동안 지속되다가, 전핵이 형성되는 시기에 멈춘다.^{4,5} 그러므로 정자가 어떻게 난자 세포질 내 Ca²⁺ 증감 현상을 유도하여 난자를 활성화시킬 수 있는가를 알아보는 것은 수정 기전을 밝히는 중요한 과정이라 할 수 있다.

정자 추출 단백질 (Sperm factor)에 의한 Ca²⁺ 증감 현상

일반적으로 세포 내 급격한 Ca²⁺ 농도의 증가는 Ca²⁺ 저장고인 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에 존재하는 inositol 1,4,5-triphosphate 수용체

주관책임자: 윤숙영, 우) 135-080 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 차의과학대학교 강남차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-2841, Fax: (02) 3468-2842
e-mail: syoon11@gmail.com

(IP₃Receptor, IP₃R)를 통한 Ca²⁺의 분비로 일어난다. 즉, 어떤 신호에 의해 난자 막에 있는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)가 diacylglycerol (DAG)과 inositol triphosphate (IP₃)로 분해되고, 여기서 생성된 IP₃가 IP₃R를 활성화하면 IP₃R가 Ca²⁺ 통로를 형성하여, 소포체에 저장되어 있던 Ca²⁺이 세포질 내로 분비되는 phosphoinositide (PI) 경로를 만든다. 생쥐와 햄스터 난자를 이용한 연구 결과에 의하면, IP₃R에 대한 항체 또는 heparin과 같은 IP₃R 저해제를 미리 미세 주입하여 IP₃R의 활성을 억제하면, 정자에 의해 수정이 일어나도 Ca²⁺ 증감 현상이 일어나지 않고 난자의 활성화도 일어나지 않는다.⁶ 반면, 특이적으로 IP₃R의 효능을 증가시키는 adenophostin A를 배란된 난자에 미세 주입하면 정자가 없어도 Ca²⁺ 증감 현상이 일어나고 난자가 활성화된다.⁷⁻⁹ 또 siRNA 방법으로 IP₃R의 발현이 억제된 난자는 정자와 수정이 되어도 Ca²⁺ 증감 현상이 나타나지 않고 난자 활성화도 일어나지 않는다.^{10,11} 이러한 보고들을 종합해보면, 난자 활성화 중에 나타나는 Ca²⁺ 농도 증가는 수정과 동시에, 정자에 의해 IP₃가 생성되는 PI 경로임을 알 수 있다.

정자가 어떻게 난자 세포질에서 IP₃를 만들어 내고 어떻게 Ca²⁺ 증감 현상을 유도하는가에 대한 여러 가지 가설이 있다. 첫째는 난자 밖에 고농도로 존재하던 Ca²⁺이 정자가 난자 막에 융합하는 과정에서 정자와 함께 유입된다 (conduit hypothesis)는 설명이다.⁵ 그러나 포유 동물의 경우 배양액 내 Ca²⁺이 완전히 제거된 배양액에서도 수정에 의한 Ca²⁺ 증감 현상이 관찰되며, 난자 내로 고농도의 Ca²⁺ 용액을 미세 주입하여도 Ca²⁺ 증감 현상은 일어나지 않아 이 설명으로는 불충분하다.¹² 두 번째 설명은 난자 막과 정자 막에 각각에 대한 수용체가 있고 수정이 일어날 때 이들 수용체가 결합하면서 상호 연관에 의해 Ca²⁺ 증감 현상이 만들어 진다는 설명이다. 즉 정자와 난자가 가지고 있는 수용체의 결합이 난자 막의 G-protein 혹은 tyrosine kinase 등과 같은 단백질을 활성화하고 그 결과 PIP₂에서 IP₃

가 생성되어 Ca²⁺ 증감 현상이 유도된다는 설명이다.^{11,13-15} 그러나 최근 발달된 보조 생식 기술인 난자 내 정자 주입 (intracytoplasmic sperm injection)을 하거나, 정자 추출물 (cytosolic sperm extract)을 난자 세포질에 미세 주입하는 경우 난자 막과 정자 막의 수용체끼리의 결합 없이도 정상적인 Ca²⁺ 증감 현상이 관찰되어 두 번째 설명으로도 충분하지 못하다.¹⁴ 세 번째 제시되고 있는 설명은 난자-정자 막 융합이 일어날 때 정자 내 가용성 단백질 (soluble factor)이 난자 내로 유입되고, 이 가용성 단백질이 난자 내 IP₃의 합성을 유도한다는 것이다.^{15,17-19} 이에 대한 설명으로 돼지 정자 두부 (head)의 단백질만 추출하여 만든 정자 추출 단백질 (sperm factor)을 배란된 생쥐 난자에 미세 주입하면 Ca²⁺ 증감 현상이 유도되며, 이때 U73122와 같은 PLC 저해제를 전 처리하면 Ca²⁺ 증감 현상이 억제된다.¹⁹ 여러 동물의 실험 결과 이 현상은 종간 특이성을 보이지 않고 있다.^{18,19} 그런데 PLC는 세포 막에 존재하는 효소로써 PIP₂를 IP₃와 DAG로 분해하는 효소이다.¹⁹ 즉 정자 추출 단백질 중 한 성분인, PLC의해 IP₃가 형성되고 그 결과 Ca²⁺ 증감 현상이 유도된 것이다.^{16,20} 지금까지 여러 가지 정자 내 단백질 중, 열과 단백질 분해 효소에 민감한 c-kit 수용체,²¹ glucosamine 6-phosphate deaminase,²² 그리고 perinuclear theca 단백질²³이 sperm factor로 제시되어 왔다. 그러나 c-kit의 경우 c-kit의 truncated 형태인 tr-kit 단백질 혹은 cRNA를 생쥐 난자에 미세 주입하면 난자의 활성화는 유도되지만 Ca²⁺ 증감 현상이 관찰되지 않았다.²¹ 또 Perinuclear theca 단백질 역시 정자 추출 단백질과 같은 반복적인 Ca²⁺ 증감 현상을 유도하지 못했다.²³ 또 포유 동물 정자에는 PLCγ1, PLCγ2, PLCβ2, PLCδ3 and PLCδ4가 발현되고 있다. 그러나 이들 합성 단백질이나 다른 유도체를 배란된 난자에 미세 주입하여도 정자에 의한 Ca²⁺ 증감 현상과 같은 반응을 유도하지 못했다.¹⁷

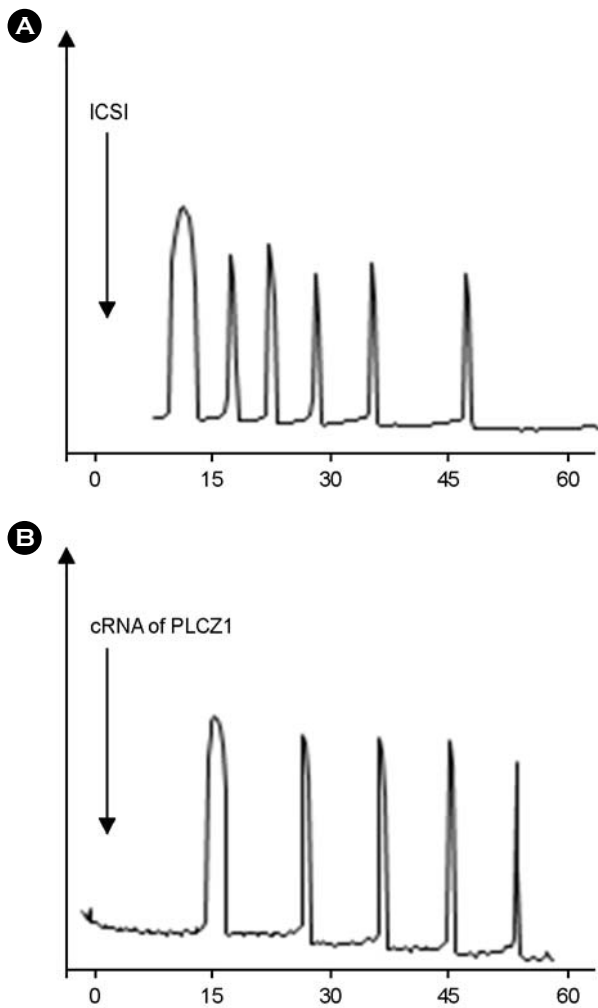


Figure 1. Traces of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations induced by injection of mouse sperm by ICSI (A) or cRNA of mouse PLCZ1 (B) in mouse eggs.

Sook-Young Yoon. The Role of Phospholipase Czeta at Fertilization in Mammals. Korean J Reprod Med 2009.

PLCZ와 Ca^{2+} -증감 현상

Saunders 등²⁴이 최초로 보고한 phospholipase Czeta (PLCZ1)는 분자 크기가 약 ~70 kDa으로, 포유동물에서 발현되는 PLC 중에서 분자 크기가 가장 작고,²⁵ PLCδ와 매우 유사한 구조이며 PLCδ와 함께 정소와 정자에서만 특이적으로 발현되지만, PLCδ보다 100배 정도 높은 활성을 가지고 있다. 생쥐 PLCZ1의 cRNA나 혹은 합성 단백질을 배란된 생쥐 난자에 미세 주입하면, 정자와 수정되었을 때

와 매우 유사한 유형의 Ca^{2+} 증감 현상을 보인다 (Figure 1).²⁴ 이때 미세 주입과 동시에 cyclohexamide를 사용하여 단백질 해독 과정을 저해하면 Ca^{2+} 증감 현상이 일어나지 않으며, 또 주입된 cRNA의 농도에 의존적으로 Ca^{2+} 반응도가 달라진다.²⁴

또한 정자 추출물을 배란된 난자에 미세 주입할 때 PLCZ1에 대한 항체를 전 처리하여 미세 주입하면 Ca^{2+} 증감 현상이 나타나지 않는데 이는, 정자 추출물 중 PLCZ1가 Ca^{2+} 증감 현상 유도 물질임을 제시하고 있다.^{24,26}

Myc, His와 같은 Tag-단백질 혹은 이에 대한 항체를 이용하여 간접적으로 측정된 자료에 의하면 생쥐 정자 하나에 20~50 fg 혹은 40~50 fg의 PLCZ1이 있다.^{24,27} 현재까지 사람, 원숭이, 생쥐, 쥐, 닭, 소, 돼지, 개, 그리고 침팬지에서 PLCZ1이 동정되었고, 608~647개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 단백질 크기는 70~75 kDa 정도이다.

한편 배란된 생쥐 난자에 PLCZ1 cRNA를 미세 주입할 때 cytochalasin D와 같은 액틴 필라멘트 저해제를 처리하여 제 2 극체 방출을 억제함으로써 2 배수체 (diploid)를 만들어 계속 배양하면, 정자에 의한 수정에서의와 비슷한 포배 형성율을 나타낸다.²⁴ 또한 사람이나 원숭이의 PLCZ1 cRNA를 배란된 생쥐 난자에 미세 주입하여도 Ca^{2+} 증감 현상과 포배를 형성하며,²⁸ 사람의 PLCZ1 cRNA를 사람 난자에,²⁹ 생쥐의 PLCZ1 cRNA를 말이나 소 난자에 미세 주입해도 역시 Ca^{2+} 증감 현상이 일어나고 배 발생도 유도되어 PLCZ1에 의한 Ca^{2+} 증감 현상과 배 발달 양상은 종간 특이성을 보이지 않는다.^{30,31} 또 transgenic RNAi 기법으로 정자 내 PLCZ1의 농도를 낮추면, Ca^{2+} 증감 현상의 빈번도도 낮아질 뿐 아니라, 난자 활성율과 포배 형성율도 낮아지는³² 반면, transgenic 방법으로 난소 내에 PLCZ1을 발현시키면 정자나 다른 활성화 신호 없이도 난자의 자발적인 활성이 이루어진다.³³ 따라서 지금까지의 보고들을 종합해 볼 때 PLCZ1이 정자로부터 분비되어 난자의 Ca^{2+} 증감 현상을 유도하는 주 단백질로 여겨진다.

PLCZ1의 구조와 성질

PLCZ1 단백질 구조는 4개의 EF-hand, 효소의 촉매적인 역할을 하는 부분 (catalytic domain)인 X와 Y 부분, 그리고 C2 부분으로, 다른 PLC와 유사한 구조이지만, PH 부분을 가지고 있지 않은 점이 다른 PLC와 구분되는 큰 차이점이다 (Figure 2).^{24,34} 4개의 EF-hand의 주 기능은 이곳에 있는 Ca²⁺ 결합 부위에 Ca²⁺이 결합하면 분자 구조적 변화를 일으켜 C2 부분과 접함으로써 효소 전체의 활성을 조절하는 것이다.³⁴ 그러므로 돌연변이로 이 부분이 잘려 없어지면 그 활성이 매우 낮아져 정상적인 PLCZ1보다 500배 높은 농도를 미세 주입하여야만 정상 PLCZ1과 유사한 Ca²⁺ 증감 현상을 유도할 수 있다.³⁵ X와 Y 부분은 촉매적인 역할을 하는 부분으로 그 염기 서열상 중간 특이적인 차이가 거의 나타나지 않아 서로 다른 종의 PLCZ1를 이용해도 Ca²⁺ 증감 현상이 유도되고, 난자 활성이 가능하게 된다. 한편, X 부분에 있는 Asp²¹⁰을 Arg (D210R)로 대체하거나, Y 부분의 Ser⁴⁰⁵를 Ala (S405A)로 대체하면 효소의 활성이 나타나지 않아 이 두 부분이 효소의 활성도를 조절하는 중요한 부분임을 알 수 있다.³⁶ 또한 X와 Y 사이의 연결 부위 (X-Y linker)가 잘린, 서로 다른 두 개의 cRNA를 함께 미세 주입하여 서로 다른 두 개의 단백질이 만들어져도 Ca²⁺ 증감 현상은 나타나며, 난자의 활성도 유도된다.³⁶ 한편, X-Y linker 부분에는 핵 위치 신호 (nuclear localization signal, NLS)를 가지고 있다. 즉, 정자에 의한 수정, 혹은 cRNA 미세 주입으로 Ca²⁺ 증감 현상을 유도한 PLCZ1이 전핵이 형성되면서 핵 위치 신호에 의해 PLCZ1이 전핵 내로 들어가면 더 이상의 Ca²⁺ 증감 현상은 나타나지 않는다.^{4,37~41} 그러나 핵 위치 신호부분에 돌연변이를 만든 cRNA를 미세 주입하면 전핵으로 유입되는 신호가 없어 전핵이 형성되어도 Ca²⁺ 증감 현상은 계속된다.^{24,37,39,40} 이때, 전핵으로 유입된 PLCZ1은 제 1세포 주기 세포 분열이 일어나는 동안 핵막 붕괴와

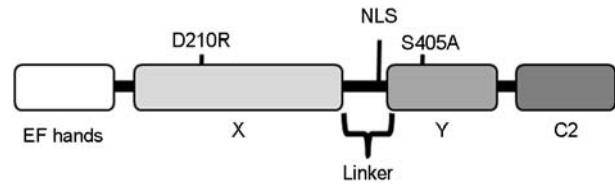


Figure 2. The domain structure of mouse PLCZ.

Sook-Young Yoon. *The Role of Phospholipase Czeta at Fertilization in Mammals. Korean J Reprod Med* 2009.

함께 세포질로 분비되면서 다시 한번 Ca²⁺ 증가를 유도하는 것으로 보고되고 있다.^{24,43}

PLCZ1은 다른 PLC 단백질과 달리, PH 부분을 가지고 있지 않다.⁴² PH 부분은 PLC 단백질이 세포막에 위치하여 PIP₂에 매우 특이적으로 결합하기 위한 구조이며, 포유 동물 난자에서 PLC 효소의 기질인 PIP₂는 주로 난자 막에 존재하므로, PLCZ1 역시 난자 막에 위치할 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위해 *Venus-PLCZ1*을 미세 주입하여 그 발현 양상을 조사한 결과 PLCZ1이 세포질 전체에 퍼져 있었다. 이는 PLCZ1이 다른 PLC와 달리, 세포질 혹은 세포 소기관에 분포함으로써 다른 PLC보다 높은 Ca²⁺ 반응을 보인다는 가능성이 제시되고 있다.³⁹

한편 수정과 동시에 시작된 난자 내 Ca²⁺ 증감 현상은 정자로부터 분비되는 PLCZ1이 난자 안으로 분비되면서 시작되며, 생쥐의 경우 수정 직 후부터 90분 동안 거의 다 분비된다. 따라서 이 정자를 다시 추출하여 다른 난자에 미세 주입하면 Ca²⁺ 증감 현상이 일어나지 않으며, 추출된 정자가 PLCZ1 항체에 대해 면역염색이 되지 않는 점으로 보아 이때 정자로부터 분비되는 물질이 PLCZ1임을 확인할 수 있다.⁴³ 정상적인 정자 내 PLCZ1의 위치는 생쥐나 소의 정자를 면역 염색하면 첨체 바로 뒤쪽 (post-acrosomal region)이나 정자 머리 중앙 (equatorial region)에 위치하며 (Figure 3), 이 부분은 해부학적으로 정자 막과 난자 막이 융합이 시작되는 위치이다.^{27,43}

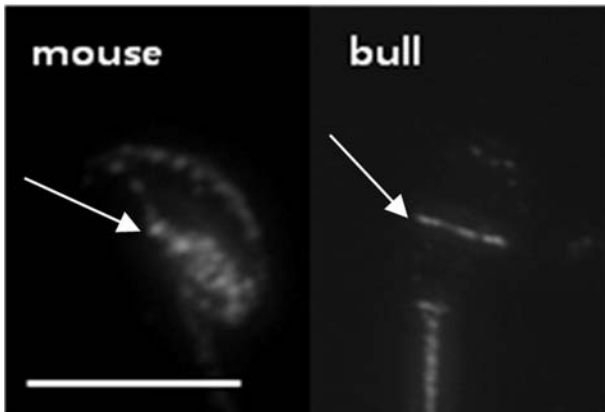


Figure 3. PLCZ1 is localized to the post-acrosomal region of mouse sperm and to the equatorial region of bull sperm. White line indicates 10 μ m

Sook-Young Yoon. *The Role of Phospholipase Czeta at Fertilization in Mammals.* Korean J Reprod Med 2009.

남성 불임에서 PLCZ1

남성 불임 치료술인 난자 세포질 내 정자 주입술 (ICSI)의 개발로 일반 체외 수정 기술의 실패가 많이 극복되었다. 그러나 아직도 ICSI 기술 후 약 3%의 환자에서는 전체적인 수정 실패가 보고되며, 어떤 환자에서는 매 시술 시 50% 이하의 낮은 난자 활성율을 보이고 있다.^{44,45} 지금까지 이를 극복하기 위한 여러 가지 방법으로 정자 주입 후 strontium 이나 ionophore를 이용하여 난자 세포질의 Ca^{2+} 증감 현상을 유도하거나, 전기적인 충격으로 세포막의 Ca^{2+} 통로를 자극하여 Ca^{2+} 증가를 유도함으로써 난자 활성화에 성공하였다.^{46,47} 그러나 이 방법들은 생리적이지 못하며, 그 안정성 역시 증명되지 않았다.⁴⁸ 최근 Yoon 등⁴⁹은 ICSI 기술 후 반복적으로 수정율이 매우 낮은 환자 군으로부터 수집된 정자를 생쥐 난자에 주입한 경우 정상 수정율을 보인 군에 비해 매우 낮은 Ca^{2+} 증감 현상을 보이며, 난자 활성화도 실패함을 보고하여 이들 정자에 PLCZ1 비 정상적으로 발현하고 있음을 보였다. 또 정상적인 수정율을 보인 환자들의 정자는 면역형광 염색 결과 생쥐와 소 정자에서 보인 것과 같이 첨체 바로 뒤쪽 (post-acrosomal region)에 PLCZ1 단

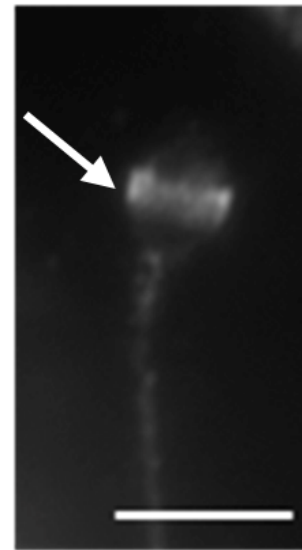


Figure 4. PLCZ1 localizes to the equatorial/post-acrosomal region of human sperm. White line indicates 5 μ m.

Sook-Young Yoon. *The Role of Phospholipase Czeta at Fertilization in Mammals.* Korean J Reprod Med 2009.

백질이 위치하고 있으며 (Figure 4),^{49,50} 약 70 kDa 크기의 단백질이 검출되는 반면, 낮은 수정율을 보인 환자의 정자는 PLCZ1이 검출되지 않거나 단백질 염색도 보이지 않아, 낮은 수정율을 보인 정자는 정상 수정율을 보인 환자 군에 비해 PLCZ1의 농도가 매우 낮거나 발현되지 않고 있음을 알 수 있다. 한편 낮은 수정율의 정자에서 결여된 것으로 여겨지는 PLCZ1을 보완하기 위한 방법으로 PLCZ1의 cRNA를 정자와 함께 주입한 결과, Ca^{2+} 증감 현상 및 난자의 활성이 유도되었다.⁴⁸ 이러한 결과를 미루어 볼 때 정자 주입술 후 건강한 난자가 활성이 되지 않는 것은 정자에 PLCZ1의 결핍, 부족, 혹은 비 정상적 발현 등으로 난자 활성화 유도가 일어나지 않으며, 결과적으로 불임의 원인이 됨을 알 수 있다.

결 론

건강한 난자를 활성화시키고 정상적인 배 발생을 위해서는 정상적인 Ca^{2+} -증감 현상이 필수적이

다. 이런 Ca^{2+} 증감 현상은 정자로부터 분비되는 PLCZ1에 의해 증가된 IP_3 에 의한 Ca^{2+} 증가로 시작된다. 따라서 정자 내에 정상적인 PLCZ1의 존재는 건강한 난자와 함께 건강한 배 발달을 이루는 중요 요인이라 할 수 있다. 현재 남성 불임의 원인 중에서 정자 내 PLCZ1 이상을 반복적인 난자 활성의 실패 원인 중 하나로 볼 수 있으며, 이에 대한 유전적, 병리적 연구가 필요하다. 또 여러 가지 화학적인 방법을 이용한 인위적인 난자 활성화 대신 PLCZ1의 합성 단백질을 이용한 치료방법의 개발과 연구를 통해 불임의 원인의 규명 및 치료가 가능할 것으로 생각된다.^{51,52}

참 고 문 헌

- Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Current Topics in Developmental Biology* 1995; 30: 21-62.
- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149(1): 80-9.
- Steinhardt RA, Epel D. Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71(5): 1915-9.
- Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 1999 211(2): 157-76.
- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol* 2002; 245: 237-54.
- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80-9.
- Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM. Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 1992; 47(6): 960-9.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; 58: 62-78.
- Jellerette T, He CL, WU H, Parys JB AND Fissore RA. Downregulation of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev Biol* 2000; 223: 238-50.
- Brind S, Swann K, and Carroll J. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are downregulated in mouse oocytes in response to sperm and adenophostin A but not to and increase in intracellular Ca^{2+} or egg activation. *Dev Biol* 2000; 223: 251-65.
- Xu Z, Williams CJ, Kpft GS, Schultz RM. Maturation associated increase in IP_3 receptor subtype 1: role in conferring increased IP_3 sensitivity and Ca^{2+} oscillatory behaviour in mouse eggs. *Dev Biol* 2003; 254: 163-71.
- Deng MQ, Fan BQ. Intracellular Ca^{2+} during fertilization and artificial activation in mouse oocytes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1996; 17(4): 357-60.
- Jones KT, Soeller C, Cannell MB. The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 1998; 125: 4627-35.
- Mehlmann LM, Carpenter G, Rhee SG, Jaffe LA. SH2 domain-mediated activation of phospholipase Cgamma is not required to initiate Ca^{2+} release at fertilization of mouse eggs. *Dev Biol* 1998; 203(1): 221-32.
- Wu H, Smyth J, Luzzi V, Fukami K, Takenawa T, Black SL, et al. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol Reprod* 2001; 64(5): 1338-49.
- Williams CJ, Mehlmann LM, Jaffe LA, Kopf GS, Schultz RM. Evidence that Gq family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev Biol* 1998; 198(1): 116-27.
- Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster oocytes. *Development* 1990; 110: 1295-302.
- Homa ST, Swann K. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Human Reprod* 1994; 9: 2356-61.
- Fissore RA, Gordo AC, Wu H. Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 1998; 49: 43-52.
- Saunders CM, Swann K, Lai FA. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp* 2007; 74: 23-36.
- Sette C, Bevilacqua A, Bianchini A, Mangia F, Geremia R. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa.

- Development 1997; 124: 2267-74.
22. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 379(6563): 364-8.
 23. Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech* 2003; 61(4): 362-78.
 24. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Roysse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129(15): 3533-44.
 25. Rebecchi MJ, Pentyala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000; 80: 1291-335.
 26. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta (zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17(2): 264-73.
 27. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, et al. Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol* 2004; 274(2): 370-83.
 28. Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. Sperm phospholipase Cz from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 2002; 124: 611-23.
 29. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. PLCz causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004; 128: 697-702.
 30. Ross PJ, Beyhan Z, Iager AE, Yoon SY, Malcuit C, Schellander K et al. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Dev Biol* 2008; 19: 8: 16.
 31. Bedford-Guaus SJ, Yoon SY, Fissore RA, Choi YH, Hinrichs K. Microinjection of mouse phospholipase C zeta complementary RNA into mare oocytes induces long-lasting intracellular calcium oscillations and embryonic development. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20(8): 875-83.
 32. Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM, Williams CJ. Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase Czeta in triggering Ca²⁺ oscillations during fertilization. *Biol Reprod* 2005; 72(4): 992-6.
 33. Yoshida N, Amanai M, Fukui T, Kajikawa E, Brahmajosyula M, Iwahori A, et al. Broad, ectopic expression of the sperm protein PLCZ1 induces parthenogenesis and ovarian tumours in mice. *Development* 2007; 134(21): 3941-52.
 34. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S. The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. *J Biol Chem* 2005; 280(22): 21015-21.
 35. Nakanishi T, Ishibashi N, Kubota H, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. Birth of normal offspring from mouse eggs activated by a phospholipase Czeta protein lacking three EF-hand domains. *J Reprod Dev* 2008; 54(4): 244-9.
 36. Kurokawa M, Sato K, Fissore RA. Mammalian fertilization: from sperm factor to phospholipase Czeta. *Biol Cell* 2004; 96(1): 37-45.
 37. Sone Y, Ito M, Shirakawa H, Shikano T, Takeuchi H, Kinoshita K, Miyazaki S. Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(3): 690-4.
 38. Ito M, Shikano T, Kuroda K, Miyazaki S. Relationship between nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *Cell Calcium* 2008; 44(4): 400-10.
 39. Yoda A, Oda S, Shikano T, Kouchi Z, Awaji T, Shirakawa H, et al. Ca²⁺ oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev Biol* 2004; 268(2): 245-57.
 40. Larman MG, Saunders CM, Carroll J, Lai FA, Swann K. Cell cycle-dependent Ca²⁺ oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 12): 2513-21.
 41. Kuroda K, Ito M, Shikano T, Awaji T, Yoda A, Takeuchi H, et al. The role of X/Y linker region and N-terminal EF-hand domain in nuclear translocation and Ca²⁺ oscillation-inducing activities of phospholipase Czeta, a mammalian egg-activating factor. *J Biol Chem* 2006; 281(38): 27794-805.
 42. Halet G, Tunwell R, Balla T, Swann K, Carroll J. The dynamics of plasma membrane PtdIns (4, 5) P2 at fertilization of mouse eggs. *J Cell Sci* 2002; 115: 2139-49.
 43. Yoon SY, Fissore RA. Release of phospholipase C zeta and [Ca²⁺]_i oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction* 2007; 134(5): 695-704.
 44. Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failures and

- abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1998; 13 Suppl 1: 155-64.
45. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 197-210.
46. Borges E Jr, de Almeida Ferreira, Braga DP, de Sousa Bonetti TC, Iaconelli A Jr, Franco JG Jr. Artificial oocyte activation using calcium ionophore in ICSI cycles with spermatozoa from different sources. *Reprod Biomed Online* 2009; 18(1): 45-52.
47. Kyono K, Kumagai S, Nishinaka C, Nakajo Y, Uto H, Toya M, et al. Birth and follow-up of babies born following ICSI using SrCl₂ oocyte activation. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(1): 53-8.
48. Rogers NT, Halet G, Piao Y, Carroll J, Ko MS, Swann K. The absence of a Ca²⁺ signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. *Reproduction* 2006; 132(1): 45-57.
49. Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K, et al. Human sperm devoid of PLC zeta 1 fail to induce Ca²⁺ release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 2008; 118(11): 3671-81.
50. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Czeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction* 2008; 23(11): 2513-22.
51. Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T, Et al. Recombinant phospholipase Czeta has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem* 2004; 279(11): 10408-12.
52. RogersNT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. Phospholipase Czeta causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004; 128: 697-702.