Mitochondrial DNA in Human Gametes

성균관의과대학 삼성제일병원, 생식생물학 및 불임연구실

전 진 현

I. 미토콘드리아의 일반적 특성

미토콘드리아는 거의 모든 진핵세포에서 관찰되는 세포소기관으로써 ATP와 같은 생체 에너지 생성에 관련된 energy metabolism, 세포의 성장과 분화, 세포의 노화 현상, 그리고 apoptosis 과정 등에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 일반적인 세포소기관과 달리 미토콘드리아는 이중막을 가지고 있으며, 자체의 circular double strand DNA, mRNA, ribosome 등을 이용하여 단백질을 합성할 수 있다. 또한, 미토콘드리아 DNA (mt DNA)를 복제할 수 있으며, 기존의 미토콘드리아로부터 분열되는 특징을 나타낸다. 그렇지만, 미토콘드리아를 구성하는 여러 가지 단백질들에 대한 유전자는 실제적으로 필수적인 몇 가지를 제외한 대부분의 유전자가 핵 내에 존재하고 있어, 정상적인 세포의 기능을 유지하는데 있어 미토콘드리아와 핵 사이의 상호조절작용은 필수적이다.

미토콘드리아의 구조는 외막 (outer membrane)과 내막 (inner membrane)이라고 하는 이중의 단위막으로 이루어져 있으며, 내막은 안쪽으로 주름져 들어가 그 표면적이 증가되어 있는 cristae를 형성하고 있다. 미토콘드리아와 cristae의 형태, 수 및 배열상태는 세포의 특성에 따라 다양하게 나타난다. cristae의 내면에는 전자전달계의 효소와 ATPase로 이루어져 있는 기본입자 (elementary particle; F1 particle)가 고르게 부착되어 있으며, 미토콘드리아 내부의 기질 (matrix)에는 mt DNA, ribosme, crystal, lipid droplet, glycogen particle 등이 존재하며, 전자밀도가 높은 입자들로 관찰되는 granule은 Ca^{2+}, Mg^{2+}과 같은 2가 양이온성 물질들이 농축되어 있다.

미토콘드리아는 세포분열 시 딸세포에 일정한 수가 유지될 수 있도록 자가복제 (self replication)하는 능력을 가지고 있으며, 세포분열과는 독립적으로 복제를 수행한다. 일반적으로 그 수명은 약 10일이며, 수명을 다하면 세포질 내의 lysosome에 의해 파괴, 처리된다. 미토콘드리아의 유전자는 핵 내에 존재하는 유전자와는 달리 비멘델적인 방법으로 세포질을 통하여 유전된다. 동물의 발생과정에서 세포질은 모계에서 유래한 난자를 통하여 다음 세대로 전달되므로, 모계의 미토콘드리아가 다음 세대로 유전되게 된다.

이상과 같은 기초지식을 토대로, 본론에서는 정자와 난자 그리고 배아 발생과정에서 미토콘드리아의 역할과 기능에 대해 살펴보고, 이러한 사실들이 생식의학 분야에서 어떠한 방향으로 적용될 수 있는 지에 대해 논의하고자 한다.

II. 정자에서의 미토콘드리아

정자형성과정 (spermatogenesis)에서 미토콘드리아는 정자뿐만 아니라 Sertoli, Leydig cell

등에서도 체세포에서와 마찬가지로 세포내의 에너지 대사와 steroid 대사에서 중요한 역할을 수행한다. 정자의 미토콘드리아는 spermatid로 분화되면서, 미토콘드리아를 구성하는 단백질의 이동과 변형을 조절하는 chaperonin으로 알려져 있는 heat shock protein 60이 발현되지 않아, spermatid 이후로는 새로운 미토콘드리아의 형성이 억제되는 것으로 보고되었다 (Meinhardt et al., 1995). 미토콘드리아 DNA (mt DNA)의 복제도 초기 정자형성과정에서는 관찰되지만, 후기에는 관찰되지 않으며, 실제적으로 성숙된 정자는 약 100개 정도의 미토콘드리아를 가지고 있다 (Hecht and Liem, 1984). 그렇지만, 이러한 복제를 조절하는 요인은 아직까지 밝혀지지 않았으며, mt DNA에서 methylation과 같은 변화도 관찰되지 않았다 (Hecht et al., 1984).

정자성숙과정 (spermiogenesis)에서 미토콘드리아는 selenium이 관련되어 있는 sheath capsule을 형성하여 꼬리의 기부로 이동하며 (Olson and Winfrey, 1992), 다른 세포들의 미토콘드리아에 비해 삼투압의 변화와 반응성 산소에 민감하지 않은 것으로 알려져 있다 (Willoughby et al., 1996; Aitken 1995). 성숙 정자의 미토콘드리아는 꼬리를 감싸고 있는 sheath를 형성하여, 정자의 운동에 필요한 에너지를 효율적으로 공급하며, 그들의 활성과 기능이 정자의 운동성, 생존력, 수정능력에 영향을 줄 수 있다는 보고들이 있다 (Folgero et al., 1993; Garner et al., 1997; Ruiz-Pesini et al., 1998). 또한, Kao 등 (1998)은 정자에서의 mt DNA 소실 (deletion)이 운동성과 수정능력의 감소와 관련되어 있음을 보고하였다.

III. 난자에서의 미토콘드리아

난자형성과정 (oogenesis)에서 난자 당 미토콘드리아의 수는 난원세포의 체세포 분열 동안 그 수가 급격히 감소하여 난자 당 5개 정도까지 감소되었다가, 난원세포의 성장과정에서 그 수는 약 10,000개까지 증가하게 된다 (Jansen and de Boer, 1998). 이러한 과정은 'bottleneck theory'와 'Muller's ratchet'에 의해 설명되어 지며, 정상적인 미토콘드리아를 후대에 물려주기 위한 생물학적인 조절과정으로 생각되어지고 있다 (Bergstrom and Pritchard, 1998; Jansen and de Boer, 1998). 하지만, 미토콘드리아의 DNA는 체세포의 DAN에 비해 돌연변이가 나타날 확률이 10배 이상 높은 것으로 알려져 있으며 (Avise, 1991; Wolstenholme, 1992), 세포분열 동안에 돌연변이에 의한 비정상적인 미토콘드리아의 축적이 일어나 질병을 유발하기도 한다 (Lynch, 1996; Sherratt et al., 1997).

포유류의 성숙 난자는 약 100,000개의 미토콘드리아를 가지고 있으며 (Piko and Matsumoeto, 1976), 이들의 대부분은 구형이며, cristae가 발달되지 않은 미분화된 구조적 특징을 나타낸다 (Stern et al., 1971). 미성숙 난자의 미토콘드리아는 세포질 내에 균일하게 분포하다가, 감수분열이 시작되면서 그 분포 양상이 변하여 극성을 갖게 된다 (Calarco, 1995). 첫 번째 감수분열 전기에 핵막 (germinal vesicle) 주위로 미토콘드리아가 이동하였다가, 극체를 방출하면서 그 주위에 많이 존재하는 것이 관찰되었다 (Van Blerkom and Runner, 1984). 본 저자 등 (Jun et al., 1999)도 생쥐의 배란된 난자의 상태에 따라 mt DNA의 양과 활성화된 미토콘드리아의 분포에서 차이가 있음을 확인하였다. 이러한 사실들은 난자의 성숙과정에서 미토콘드리아가 중요한 역할을 수행함을 시사하는 것으로 생각된다. 또한, 난자형성과정에서 대부분의 난자가 퇴화되는 것이 미토콘드리아와 관련되어 있을 것으로 생각되며, 나이가 많은 여성의 난자와 상태가 좋지 않은 난자에서 mt DNA 돌연변이가 높은 빈도로 나타나는 것이 보고되었다 (Keefe et al., 1995; Muller-Hocker et al, 1996).

IV. 수정과 배아 발생과정에서의 미토콘드리아

정자의 미토콘드리아가 수정 후에 어떠한 과정으로 퇴화되는지에 대해서는 명확하지 않지만, 전자현미경과 형광현미경을 이용한 관찰에서 4-8 세포기 배아에서 그 퇴화가 보고되었다 (Szollosi, 1965; Cummins et al., 1997). Sutovsky 등 (1996)은 정자의 미토콘드리아에 존재하는 ubiquitin이 난자의 세포질 내에서 인식되어 선택적으로 파괴된다는 가설을 제시하였다. Kuretake 등 (1996)은 생쥐의 정자의 두부만을 분리하여 난자에 주입하여 정상적인 발생과 산자를 보고하였으며, Ahmadi와 Ng (1997)은 sodium cyanide를 처리하여 미토콘드리아를 손상시킨 생쥐 정자를 난자에 주입하여서도 같은 결과를 보고하였다. 또한, 생쥐를 이용한 종내 교배 (intraspecific crosses) 모델에서 모계 미토콘드리아의 유전이 분자생물학적인 PCR 방법으로 확인되었다 (Kaneda et al., 1995). 이러한 결과는 부계의 미토콘드리아를 배제하고 모계의 미토콘드리아만으로 정상적인 발생이 가능함을 시사한다.

수정 후 전핵이 형성되면 그 주위에 rhodamine에 의해 형광 염색되는 활성화된 미토콘드리아들이 밀집되며, 이러한 현상은 난할 시 간기의 핵에서 반복되어 나타나고, 활성화된 미토콘드리아의 분포 양상이 배아의 발생능력과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다 (Tokura et al., 1993; Barnett et al., 1996; 1997). 난자와 초기 배아의 미토콘드리아의 수는 포배기까지는 증가하지 않다가, 수정 후 약 7일쯤 되는 egg cylinder 시기부터 그 수가 증가하는 것으로 보고되었으며 (Ebert et al., 1988), 저자도 생쥐 배아의 체외배양 시 수정 후 6일째 outgrowth 되는 배아에서 mt DNA의 양이 증가함을 competitive PCR 방법으로 확인하였다 (Jun, 1999). 그러나, mt DNA 복제에 관련된 조절기작은 아직까지 알려져 있지 않다. 초기 발생과정에서 미토콘드리아의 수는 증가하지 않지만, 미토콘드리아 mRNA의 증가와 cristae의 발달 등과 같은 그 기능적, 구조적인 분화과정은 활발하게 진행된다 (Stern et al., 1971; Piko and Taylor, 1987; Taylor and Piko, 1995). 이러한 분화과정은 mitochondrial RNA polymerase, mitochondrial transcription factor A와 같은 핵 내의 유전자와 미토콘드리아의 상호작용에 의해 조절되는 것으로 생각된다 (Schultz et al., 1998; Larsson et al., 1998). 또한, 생쥐 초기 배아의 체외배양 시 발생 속도가 느리거나 발생이 중지된 배아에서 정상적인 배아에 비해 mt DNA 양이 감소되어 있고, 미토콘드리아의 구조적인 분화가 지연됨을 관찰하여, 초기 배아의 발생능력과 미토콘드리아의 수와 분화 정도가 관련이 있을 것으로 생각된다 (Jun, 1999). Brenner 등 (1998)과 Barritt 등 (1999)은 난자와 초기 배아에서 mt DNA의 돌연변이를 확인하는 연구에서, 배아의 발생능력과 mt DNA의 돌연변이율 사이에 관련성이 있음을 보고하였다.

V. 생식의학 분야에서의 미토콘드리아의 중요성

위에서 언급한 바와 같이, 난자 내의 미토콘드리아는 배아의 발생능력과 밀접한 관련성을 가지고 있으므로 이에 대한 여러 가지 연구들이 현재 진행 중이다. 최근에는 인간의 체외수정 및 배아이식술 (human IVF-ET program)에서 난자의 세포질 공여에 의해 성공적인 임신과 출산이 보고되었고 (Cohen et al., 1998), 공여 세포질 내에 존재하는 미토콘드리아의 유전이 확인되었다 (Barritt et al., 1999). 아직까지는 세포질 공여의 효용성에 대한 논란이 많지만, mt DNA의 돌연변이가 확인된 가계에서의 미토콘드리아 공여는 머지 않아 시도될 것으로 생각된다.

체세포의 핵을 난자의 세포질에 이식하여 세계 최초로 clone을 보고 (Wilmut et al., 1997) 하였던 영국 Roslin 연구소의 최근 연구 결과에서, 세포핵의 유전자가 동일한 개체들에서 그 미토콘드리아의 유전자가 상이함이 보고되었다 (Evans et al., 1999). 이는 Dolly 등과 같은 clone들이 세포질까지 동일한 완벽한 clone이 아님을 시사하며, 이러한 이질성은 실제적인 표현형의 차이로 나타날 수 있다. Kenyon과 Moraes (1997)는 mt DNA가 결여된 세포주 (Rho 0 cell line)를 이용한 실험에서, 종에 따라서 미토콘드리아의 기능을 유지, 조절하는 기작에 차이가 있음을 보고하였다. 그리고, 이종간의 핵 치환에 대한 여러 가지 실험들이 시도되고 있지만, 핵과 미토콘드리아 유전자의 상호작용을 고려해 볼 때 이종간의 핵 치환에는 해결해야 될 많은 문제점이 있을 것으로 생각된다.

VI. 결 론

이와 같은 미토콘드리아의 특성과 기능에 대한 많은 사실들은 기초 생물학뿐만 아니라 임상 의학에서도 새로운 연구 방향들을 제시해 주고 있다. 미토콘드리아의 모계 유전 현상은 동물의 진화과정에 대한 많은 정보를 제공해 주고 있으며, apoptosis와 노화현상 같은 분야의 연구에서도 미토콘드리아의 관련성에 대해 활발한 연구가 진행 중이다. 생식의학 분야에서 미토콘드리아에 대한 연구는 정자와 난자 그리고 초기 배아에서 진행되는 복제와 분화의 조절에 대한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각되며, 세포질 공여와 이종간의 핵 치환 등과 같은 분야의 임상에의 적용은 여러 가지 문제점들이 야기될 수 있으므로 세심한 기초 연구가 필수적인 것으로 생각된다.

VII. 참 고 문 헌

Ahmadi A, Ng SC. Sperm head decondensation, pronuclear formation, cleavage and embryonic development following intracytoplasmic sperm injection of mitochondria-damaged sperm in mammals. Zygote 1997; 5: 247-53.

Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod Fertil Devel 1995; 7: 659-68.

Barnett DK, Kimura J, Bavister BD. Translocation of active mitochondria during hamster preimplantation embryo development studied by confocal laser scanning microscopy. Devel Dynamics 1996; 205: 64-72.

Barnett DK, Clayton MK, Kimura J, et al. Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria. Mol Reprod Devel 1997; 48: 227-37.

Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, et al. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. Mol Hum Reprod 5; 927-33.

Barritt JA, Cohen J, Willadsen RT, et al. Mitochondrial inheritance and the incidence of heteroplasmy after ooplasmic transplantation. Proceedings of the 55th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine; 1999 Sept 25-30; Toronto, Canada, Abstract O-081.

Bergstrom CT, Pritchard J. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. Genetics 1998; 149: 2135-2146.

Brenner CA, Wolny YM, Barritt JA, et al. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos. Mol Hum Reprod 4: 887-92.

Calarrco PG. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. Developmental Genetics 1995; 16: 36-43.

Cohen J, Scott R, Alikani M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. Mol Hum Reprod 4: 269-80.

Cummings JM, Wkayama T, Yanagimachi R. Fate of microinjected sperm components in the mouse oocyte and embryo. Zygote 1997; 5: 301-8.

Ebert KM, Liem H, Hecht NB. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. J Reprod Fertil 1988; 82: 145-9.

Evans MJ, Gurer C, Loike JD, et al. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. Nat Genet 23: 90-3.

Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, et al. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. Hun Reprod, 1993; 8: 1863-8.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol Reprod 1997; 57: 1401-6.

Hecht NB, Liem H. Mitochondrial DNA is synthesized during meiosis and spermatogenesis in the mouse. Exp Cell Res 1984; 154: 293-8.

Hecht NB, Liem H, Kleene KC, et al. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alternation of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. Devel Biol 1984; 102: 452-61.

Jansen R, de Boer K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. Mol Cell Endocrinol 145: 81-8.

Jun JH. Dynamics of cytoskeletons and mitochondria in the mouse ovulated oocytes and early embryos [dissertation]. Seoul, Korea: Hanyang Univ.; 1999.

Jun JH, Lee HS, Kim JW, et al. Mitochondrial malfunctions affect the quality and the destiny of ovulated oocytes in the mouse. Proceedings of the 11th World Congree on In Vitro Fertilization and Human Reproductive Genetics; 1999 May 9-14; Sydney, Australia, Abstract O-075.

Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 4542-6.

Kao SH, Cha HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. Mol Hum Reprod 4: 657-66.

Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. Fertil Steril 1995; 64: 577-83.

Kenyon L, Moraes CT. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 9131-5.

Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, et al. Fertilizatiom and development of mouse oocytes injected with isolated sperm head. Biol Reprod 1996; 55: 789-95.

Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, et al. Mitochondrial transcription factor A is neccessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. Nat Genet 1998; 18: 231-6.

Meinhardt A, Parvinen M, Bacher M, et al. Expression of mitochondrial heat shock protein 60 in distinct cell types and defined stages of rat seminiferous epithelium. Biol Reprod 1995; 52:

798-807.

Muller-Hocker J, Schafer S, Weis S, et al. Molphological-cytochemical and molecular genetic analyses of mitochondria in isolated human oocytes in the reproductive age. Mol Hum Reprod 1996; 951-8.

Olson GE, Winfrey VP. Structural organization of surface domains of sperm mitochondria. Mol Reprod Devel 1992; 33: 89-98.

Piko L, Matsumoto L. Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. Devel Biol 1976; 49: 1-10.

Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. Devel Biol 123: 364-74.

Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. Clin Chem 1998; 44: 1616-20.

Schultz RA, Swoap SJ, McDaniel LD, et al. Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues. J Biol Chem 273: 3447-51.

Sutovsky P, Navara CS, Schatten G. Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. Biol Reprod 1996; 55: 1195-205.

Taylor KD, Piko L. Mitochondrial biogenesis in early mouse embryos: expression of the mRNAs for subunits IV, Vb, and VIIc of cytochrome c oxidase and subunit9 (P1) of H^+-ATP synthase. Mol Reprod Devel 40: 29-35.

Willoughby CE, Mazur P, Peter AT, et al. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. Biol Reprod 1996; 55: 715-27.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997; 385: 810-3.