

한국인 남성 불임환자에서 Y염색체내 미세결실의 분자유전학적 분석

영동제일병원 불임의학연구소, 한양대학교 자연과학대학 생물학과¹,
연세대학교 의과대학 비뇨기과²

윤현수 · 이정현 · 서주태 · 김해정 · 이동률,
전종식 · 조정현 · 김문규¹ · 이무상² · 노성일

Molecular Genetic Analysis of Microdeletions in Y Chromosome from Korean Male Infertility Patients

Hyun Soo Yoon, Jeong Hen Lee, Ju Tae Seo, Hae Jung Kim,
Dong Ryul Lee, Jong Sik Jeon, Jung Hyun Cho,
Moon Kyoo Kim¹, Moo Sang Lee² and Sung Il Roh

*Infertility Research Center, Jeil Women's Hospital; Department of Biology, Hanyang University¹
Department of Urology, Yonsei University²*

=Abstract=

Genes on the long arm of Y chromosome, particularly interval 6, are believed to play a critical role in human spermatogenesis. The objective of this study was to validate a sequenced-tagged site(STS)-mapping strategy for the detection of Yq microdeletion and to use this method to determine the proportion of men with Yq microdeletions in idiopathic, obstructive, nonobstructive azoospermia, severe OATS and in normal males. We analyzed three STS markers mapped to interval 6 within long arm of the Y chromosome from 106 nonobstructive, 30 obstructive azoospermia, 15 severe OATS patients, and normal 42 males in Korean men. By PCR, we tested leukocyte DNA, for the presences of STS markers(DAZ, sY129 and sY134) and SRY gene as internal control. And PCR results were confirmed by Southern hybridization, and were investigated by SSCP analysis for DAZ gene mutation. None of 42 normal males and 30 obstructive azoospermia had microdeletions. Of the 15 severe OATS typed with DAZ, sY129 and sY134, 3(20.0%) patients failed to amplify 1 or more STS markers, and of the 106 nonobstructive azoospermia typed with DAZ, sY129 and sY134, 12(11.3%) patients failed to amplify 1 or more STS markers. From these results, high prevalence(12.4%) of Yq deletion(DAZ, sY129, sY134) in men with nonobstructive idiopathic azoospermia and severe OATS were observed in Korean infertility patients. To avoid the infertile offspring by assisted reproductive technique using ICSI or ROSI, preimplantation genetic diagnosis will be needed in IVF-ET program.

Key Words: Male infertility, Azoospermia, Molecular Genetic Diagnosis, Y chromosome microdeletion, Azoospermic Factor(AZF), Deleted in Azoospermia(DAZ)

서 론

인간의 고환에서 정자의 형성과정은 호르몬에 의한 내분비 조절과 고환내 여러 종류의 체세포에서 합성되어 분비되는 국부조절인자, 그리고 정원세포에서 정모세포, 정세포 그리고 정자에 이르는 각 과정에서 발현되는 유전자에 의해 조절된다. 이러한 과정은 매우 복잡한 세포의 분화 과정으로 전형적인 간세포인 정원세포에서 정자에 이르기까지 약 70일 정도 소요되며 최소한 3회 이상의 체세포 분열과 2회의 감수분열 과정을 거치게 된다. 정자형성 조절인자의 결함에 의한 정자형성장애에 의하여 남성불임이 유발될 수 있으며, 전체 성인남성의 약 2%는 정자형성장애로 인하여 불임증상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 남성불임의 원인으로 내분비계의 장애, 사정장애, 박테리아나 바이러스의 감염, 면역학적 요인, 정계정맥류, 정류고환, 합성 스테로이드에 의한 불임 등이 알려져 있으나, 원인을 규명할 수 없는 불임증상도 매우 많은 비율을 차지한다. 남성불임환자의 약 10%는 무정자증을 보이거나 oligoasthenoteratozoospermia(OATS) 증상을 나타낸다. 대부분의 감소정자증과 원인을 규명할 수 없는 무정자증은 최근 들어 보조생식술이 매우 발달되었음에도 불구하고, 정확한 진단과 근본적인 치료방법이 확립되지 않은 상태이다.

수술적 교정이 불가능한 폐쇄성 무정자증이나 선천성정관형성부전(congenital bilateral absence of the vas deferens, CBAVD)으로 인한 무정자증 환자에서 불임을 해결하기 위한 방법으로 미세수술적 부고환 정자 흡입술(Microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA)과 IVF를 이용한 방법이 1985년 소개된 후, 최근 개발된 intracytoplasmic sperm injection(ICSI) 방법이 불임치료에 이용되고 있다(Silber et al., 1994). 그러나 부고환 전체의 폐색이나 부고환 형성부전 또는 부고환 절제술을 받은 경우에는 MESA를 이용한 정자채취가 불가능하므로, 이러한 환자에서는 고환조직에서 얻은 정자(Testicular biopsy sperm extraction, TESE)로 ICSI를 시도하여 수정시킨 후 배아 이식을 통하여 높은 임신성공률이 보고되고 있다(Devroey et al., 1995). 또한 고환에서 정자형성 장애를 나타내는 비폐쇄성 무정자증 불임환

자들을 치료하기 위한 방법으로 multiple TESE-ICSI와 round spermatid injection(ROSI) 방법이 이용되고 있다. 비폐쇄성 무정자증 환자에서도 고환의 제한된 부위에서 정자가 형성되므로 multiple-TESE 방법으로 정자를 얻을 수 있으며(Silber, 1995), 정자를 채취할 수 없을 경우에는 정자가 만들어지기 전단계인 원형정세포를 난자 내에 주입하여 수정을 유도하는 ROSI(Tesarik et al., 1995) 방법이 불임치료에 이용되고 있다. 그러나 현재 널리 이용되고 있는 ICSI에 의한 수정도 유전학적인 측면에서 그 안정성이 입증되지 않은 상태이다. ICSI 방법으로 수정된 배아에서 염색체 이상이 높다는 보고가 있으며(Martin et al., 1988), 이에 의한 유산율도 높을 것으로 추측할 수 있지만 자연적인 수정에 의한 임신에서도 50% 이상의 배아가 착상에 실패하거나 유산되는 것으로(Hertig et al., 1959) 알려져 있어, ICSI에 의한 수정에서 유전적으로 비정상적인 수정란이 높은 비율로 형성되는지에 대해서는 논쟁의 대상이 되고 있다. 그런데 ICSI에 의한 수정과정에서는 정자의 첨체반응, 난자의 투명대에 부착, 투명대 통과, 난자와의 융합단계가 생략되므로 수정시 정자의 선택이 이루어지지 않는다. 그러므로 남성불임환자에서 여러 가지 방법으로 정자를 얻은 후 ICSI를 위하여 선택한 정자에 불임요인이 존재할 경우 불임요인은 후손에 전달될 수 있다.

그런데 남성에서 불임증상을 나타내는 원인으로서는 염색체의 수적, 구조적 이상과 염색체내 유전자 수준의 이상으로 구분할 수 있으며, 유전자 수준의 불임요인은 세분하여 3 종류로 구분할 수 있다. 첫번째 종류는 정자가 형성되는 과정에서 생식세포 내에서 발현되는 유전자로서 protamine유전자와, 전이단백질 유전자(Hecht, 1990), 첨체의 proacrosin을 합성하는데 필요한 sperm-head specific protease 유전자(Adham et al., 1989), 그리고 Y 염색체 상에 존재하는 것으로 알려진 AZF 유전자(Vogt, 1992, 1995) 등이 있다. 두 번째 종류에는 고환의 분화와 발생과정에서 발현되는 유전자로 X 염색체 상에 존재하는 남성호르몬 수용체 유전자(Griffin, 1992)와 Y 염색체에 존재하는 SRY(Lovell-Badge, 1992) 등이 있다. 마지막으로 고환에서 정자형성을 조절하는 Sertoli 세포와 Leydig 세포 그리고 생식수관계의 형성을 조절하는 유전자로 선천성정관형성부전증을

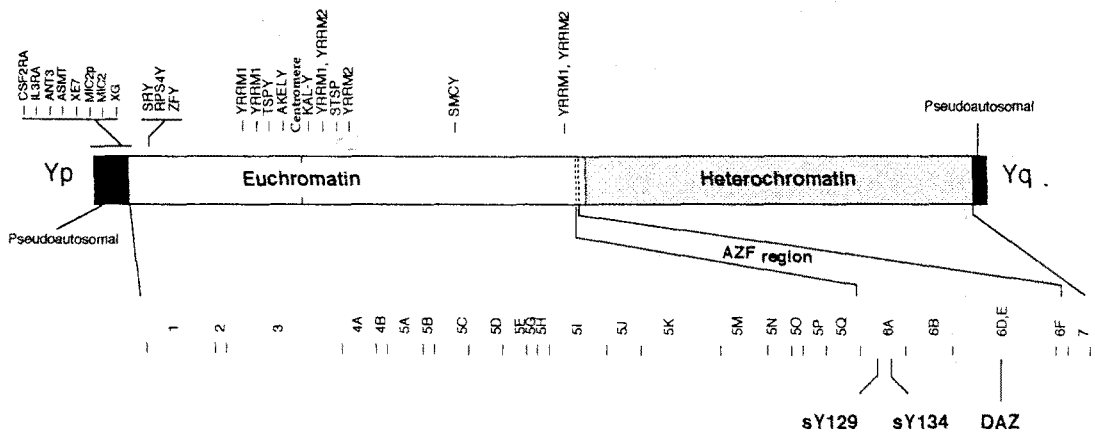


Fig. 1. Genetic map and deletion map intervals of human Y chromosome.

유발하는 cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) 유전자 등이 있다. 최근 분자생물학 및 유전학의 발달로 남성호르몬의 수용체 유전자에 대한 돌연변이를 밝혀거나, 정자형성과정을 조절하는 유전자들의 기능이 밝혀지고 있다. 염색체 수준에서는, 남성불임환자에서 Y염색체 장완의 현미경적 결실이 보고된 바 있으며(Tiepolo and Zuffardi, 1976; Yunis et al., 1977; Fitch et al., 1985), dicentric Y 염색체(Ataya et al., 1983; Chandley et al., 1986), ring Y 염색체(Micic et al., 1990), 그리고 Y 염색체의 전좌(Andersson et al., 1988)를 나타내는 남성도 불임을 나타내는 것으로 보고되었으며, 이러한 불임의 원인은 핵형분석을 통하여 진단이 이루어지고 있다.

인간의 Y 염색체는 pseudoautosomal region과 SRY 유전자를 포함하고 있는 단완과 heterochromatic region과 euchromatic region으로 구성된 장완, centromere 부분으로 이루어졌다(Figure 1). 단완의 말단에 존재하는 pseudoautosomal region은 체세포 분열 및 감수분열 시 X 염색체와 짝짓기(pairings)에 관여하는 부분이며, SRY (testis-determining gene)은 남성으로의 분화과정에 발현되는 유전자로 알려져 있다(Figure 1). 인간에서 남성의 불임과 관련된 Y 염색체에 대한 연구는 Vollrath 등(1992)과 Foote 등(1992)에 의해 Y 염색체 상에 이상이 있는 96명으로부터 결실지도(deletion map)가 작성됨으로써 Y 염색체 상에 존재하는 유전자가 남성의 불임과 관련이 있는 것을 알게되었다. Vollrath 등(1992)에 의해 작성된 결실지도의 대부분은 중합효소 연쇄반응에 의해 쉽게 증폭될 수 있는 STS(sequence-tagged site)

marker로 이루어져 있으며, 이러한 STS marker들은 Y 염색체의 euchromatic region에서 220 kb 마다 존재하고, 서로간에 배열된 순서를 알 수 있는 STS map으로 구성되어 있다.

남성의 불임과 Y 염색체 상에 존재하는 유전자의 관련성에 대한 연구는 무정자증을 나타내는 남성불임환자의 Y 염색체를 현미경으로 관찰할 때 부분적인 결실이 존재하는 것을 발견하면서 시작되었다. 1976년 Tiepolo와 Zuffardi는 무정자증 남성의 Y 염색체 장완에서 현미경으로 관찰 가능한 결손을 관찰하여 Yq에는 정자형성을 조절하는 azoospermic factor(AZF)가 존재한다고 제안하였으며, 그 후 interstitial DNA probe을 이용한 Yq의 microdeletion에 대한 연구보고에 의해 AZF의 존재가능성이 증명되었고, AZF 부위에 존재하는 유전자를 규명하고자 하였다. Ma 등(1993)은 3개의 overlapping interstitial deletion을 이용하여 RNA recognition motif을 가지는 유전자인 YRRM1과 YRRM2를 확인하였다. 이러한 YRRM1과 YRRM2는 Y 염색체에 여러 곳에 존재하고 있으나(Figure 1), AZF로서의 역할에 대해서는 정확하게 규명되지 않았다. Reijo 등(1995)은 무정자증 남성에서 Y 염색체의 STS marker를 이용하여 Ma 등(1993)이 사용했던 것보다도 더 정교한 Y 염색체의 STS map을 작성하였다. 89명의 무정자증 남성으로부터 발견된 12개의 결실이 overlapping되는 것을 보고하였고, overlapping 부위에서 남성불임과 관련이 있는 새로운 유전자인 DAZ(deleted in azoospermia)를 확인하였으며, YRRM1과 YRRM2가 AZF와 무관하다는 것을 보고하였다. Najmabadi 등(1996)은

50명의 무정자증 남성과 10 명의 희소정자증 남성에서 Y 염색체의 interval 6에 대해 26개의 STS를 이용하여 mapping한 결과 11명에서 미세 결실을 보고하였고, 결실된 4 부위가 Page 등이 발견한 DAZ와 일치하지 않음을 보고하였다. 또한 Reijo 등(1995)에 의해 확인된 DAZ 유전자는 RNA recognition motif와 72 nucleotide가 7번 반복되는 DAZ consensus repeat의 2개 domain으로 구성되어 있는 것으로 보고되었다. 따라서 Y 염색체상의 무정자증을 나타내는 유전적인 요인인 AZF에 대한 분석은 남성불임을 진단하고 원인을 규명하는데 매우 중요한 요소이며, 미세결실이 없는 무정자증 환자나 OATS 환자에서도 Y 염색체 상에 존재하는 유전자의 돌연변이에 대한 연구가 불임의 유전적인 요인을 밝히는데 매우 중요하다.

그런데 Y 염색체 상에 존재하는 유전자에 이상이 있을 경우에는 보조생식술을 이용한 임신으로 출생되는 남아도 아버지와 동일한 불임증상을 나타낸다. 미세조작법을 이용한 보조생식술로 ICSI를 이용한 수정방법이 불임클리닉에서 널리 이용되면서 이러한 유전적인 요인에 대한 문제점들이 제기되어 왔으나 한국인 남성불임환자를 대상으로 불임의 유전적 요인에 대한 연구는 아직 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구는 무정자증을 나타내는 한국인 무정자증 남성불임환자에서 Y 염색체의 미세결실 유무를 조사하고, DAZ 유전자의 RNA recognition motif를 구성하는 domain에서의 mutation을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상 및 STS markers

연구대상은 영동제일병원에 내원한 남성 불임 환자중 정액검사를 통하여 무정자증으로 진단된 남성불임환자 136명(폐쇄성 무정자증 30명, 비폐쇄성 무정자증 106명)과 OATS 15명을 대상으로 하였고, 양성 대조군으로는 가임 능력이 증명된 fathered male 42명을 대상으로 하였으며, 연구의 음성 대조군으로는 여성을 대상으로 하였다. 연구에 사용한 STS marker는 Reijo 등 (1995)과 Najmabadi 등(1996)에 의해 원인미상의 비폐쇄성 무정자증 환자에서 결실 빈도가 가장 높은 STS marker로 보고된 DAZ, sY134, sY129를 사용하였다. 또한 남성의 검증과 PCR 반응의 양성 대조

군으로 SRY 유전자를 사용하였다.

2. 연구방법

1) 말초혈액에서 genomic DNA의 분리

각 실험군에서 채취한 말초혈액은 채혈 즉시 항응고제를 첨가하여 microcentrifuge tube에 분주한 후 -70℃에 보관하여 사용하였다. 말초혈액으로부터 임파구를 분리하여 1X SSC로 2회 세척한 후 100µg proteinase K(Sigma, USA), 0.5% SDS, 0.2 M sodium acetate (pH7.0)용액에서 16시간 동안 56 ℃에서 반응하였다. Genomic DNA를 얻기 위해 phenol 추출법을 이용하였으며, 수용액 층을 분리하여 동량의 100% ethanol로 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하였다. 세척된 genomic DNA는 건조한 후 실험 시 멸균수에 녹여 이용하였다.

2) 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

중합효소 연쇄반응에 이용한 DAZ 유전자, sY129, sY134, SRY 유전자의 primer는 한국생공(주)에 의해 합성하였다(Table 1). 반응 조건은 최종 50µl에 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 각 0.2mM dNTP, 50pmol forward primer, 50pmol reverse primer, 1.25 units의 Taq DNA polymerase(Boehringer Mannheim, Germany)으로 조정하였다. DAZ와 SRY 유전자의 증폭은 multiplex법을 이용하여 동시에 증폭하였고, sY129와 sY134에 대해서는 각각 증폭하였다. 반응은 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer, USA)에서 94℃에서 5분 동안 반응 후 SRY와 DAZ 유전자의 경우 30 cycle(94℃, 1분; 60℃, 1분; 72℃, 1분), sY134와 sY129는 30 cycle(94℃, 1분; 58℃, 1분; 72℃, 1분)의 DNA 증폭을 수행한 후 최종적으로 72℃에서 10분 동안 extension 하였다. 반응 후 증폭산물은 2% agarose gel 전기영동방법으로 분석하였다.

3) DAZ 유전자의 Southern hybridization 분석

Hybridization에 이용한 DAZ 유전자의 probe는 DIG-labelled dUTP를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 표지하였다. 표지된 probe는 1% agarose gel 전기영동을 수행하여 agarose gel로부터 증폭산물을 포함하고 있는 부분을 오려낸 후, QIA quick Gel Extraction Kit(Qiagen, Germany)로 probe를 정제하여 사용하였다. 각 실험군에서 분리된 10µg의 genomic DNA를 제한효소 EcoRI로

Table 1. Primer sequence of SRY, DAZ, sY129 and sY134

STS	Primer	Sequence	Diagnostic size
SRY	forward	5' -gtt gtc cag ttg cac ttc gct gca-3'	295 bp
	reverse	5' -gtt gaa cgc att cat cgt gtg gtc-3'	
DAZ	forward	5' -gtg tta cca ggc aaa atc g-3'	348 bp
	reverse	5' -gaa ccg tat cta cca aag cag c-3'	
sY129	forward	5' -agc ttc agg agg ttc aaa ac-3'	194 bp
	reverse	5' -aag tgg gac cta agc tac ga-3'	
sY134	forward	5' -gtc tgc ctc acc ata aaa cg-3'	301 bp
	reverse	5' -acc act gcc aaa act ttc aa-3'	

로 16시간 이상 digestion한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동 하였다. 영동 후 agarose gel을 depurination, denaturation, neutralization한 후 DNA를 positively charged nylon membrane(Boehringer Mannheim, Germany)으로 20X SSC에서 1시간 동안 vacuum transfer 하였다. Hybridization은 5X SSC, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking reagent 용액에서 10ng/ml의 DIG-labelled DAZ probe을 이용하여 70℃에서 16시간 동안 실시하였다. 비특이적 결합을 제거하기 위해 70℃에서 0.1% SDS가 첨가된 5X SSC로 각 15분 동안 2번 세척하였다. 특이적 hybridization을 관찰하고자 DIG detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다.

4) DAZ 유전자 증폭산물의 SSCP 분석

각 실험군으로부터 DAZ 유전자의 증합효소 연쇄반응 증폭산물을 formamide buffer(98% formamide, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)로 10배 희석한 후 95℃에서 5분 동안 반응한 후 즉시 얼음에 보관하였다. 2µl의 sample을 0.5X MDE gel(AT Biochem, USA)에 loading 한 후 0.6X TBE buffer에서 6W로 16시간 동안 상온에서 전기영동 하였다. SSCP 변이를 확인하기 위해 silver staining kit(Promega, USA)를 이용하였다.

결 과

1. 무정자증 환자에서 PCR를 이용한 Y 염색체의 미세결실에 대한 탐색

각 STS marker에 대하여 PCR를 수행한 결과 재현성 있게 295bp(SRY), 348bp(DAZ), 194bp(sY129), 301bp(sY134)의 증폭산물을 얻을 수 있었으며, 음성대조군인 여성의 DNA로부터는 어떠한 증폭산물도 확인할 수 없었다(Figure 2, 3).

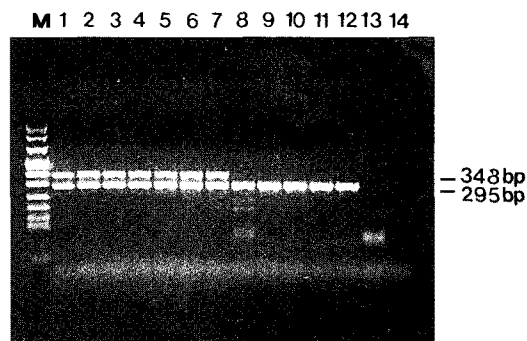


Fig. 2. Detection of DAZ gene deletions in azoospermic males by PCR.

Lane 1-2, positive control (fathered males)
Lane 3-7, azoospermic males without deletion of DAZ gene
Lane 8-12, azoospermic males with deletion of DAZ gene
Lane 13, negative control (female)
Lane 14, negative control (no DNA)
M, molecular weight marker VIII (Boehringer Mannheim)

2. DAZ 유전자의 Southern hybridization 분석

Deletion 빈도가 가장 높은 STS marker인 DAZ 유전자의 결실을 확인하기 위하여, genomic DNA로부터 southern hybridization(Figure 4)을 수행한 결과 fathered male에서와 PCR 반응에 의한 분석 시 결실이 없는 것으로 확인된 시료에서는 약 2kb의 band를 확인할 수 있었으나 PCR 방법으로 결실이 확인된 시료에서는 어떠한 band도 확인할 수 없었다. 이는 severe OATS 환자나 무정자증 남성에서 Y 염색체의 미세결실을 확인하는 과정에서 PCR 방법이 유용한 것으로 나타났다.

3. 각 STS marker에 따른 미세결실의 빈도

결실빈도가 가장 높은 것으로 알려진 STS marker를 사용하여 15명의 severe OATS 환자와

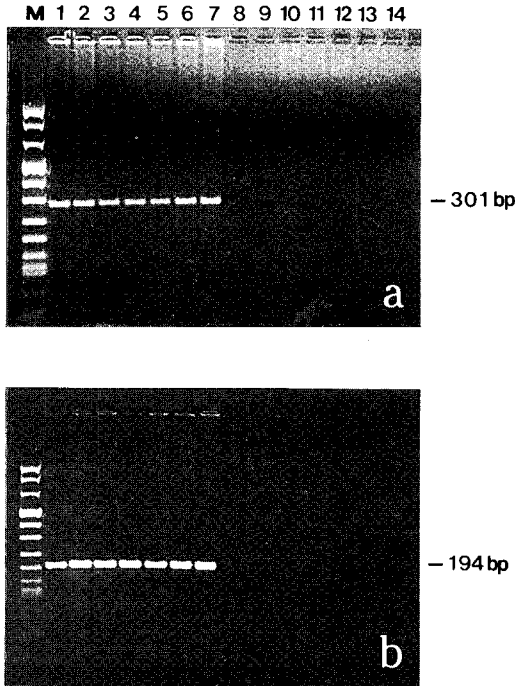


Fig. 3. Detection of sY134(a) and sY129(b) deletions in azoospermic males by PCR.
 Lane 1-2, positive control (fathered males)
 Lane 3-7, azoospermic males without deletion
 Lane 8-12, azoospermic males with deletion
 Lane 13, negative control (female)
 Lane 14, negative control (no DNA)
 M, molecular weight marker VIII (Boehringer Mannheim)

무정자증 환자 136명과 fathered male 42명을 분석한 결과(Table 2), OATS에서는 총 3명(20.0%)에서 Y 염색체의 미세결실을 보였는데 DAZ 유전자는 2명(13.3%)에서, sY129와 sY134에서는 각각 한 명(6.6%)에서 결실이 나타났다. 무정자증 환자에서 폐쇄성으로 진단된 30명에서는 각각의 STS marker에서 결실을 보이지 않았으나, 비폐쇄성 무정자증 환자 106명중 12명(11.3%)에서 Y 염색체의 미세결실을 보였는데, DAZ의 경우 10명(9.4%)에서 sY134와 sY129의 경우에는 8명(7.5%)에서 결실을 나타냈다. 하지만 양성대조군인 fathered male에서는 연구에 사용된 모든 STS marker에서 어떠한 결실도 관찰되지 않았다.

4. Y 염색체 미세결실을 가진 환자의 임상적 특징(Table 3)

Y 염색체 미세결실을 나타낸 남성 불임환자의

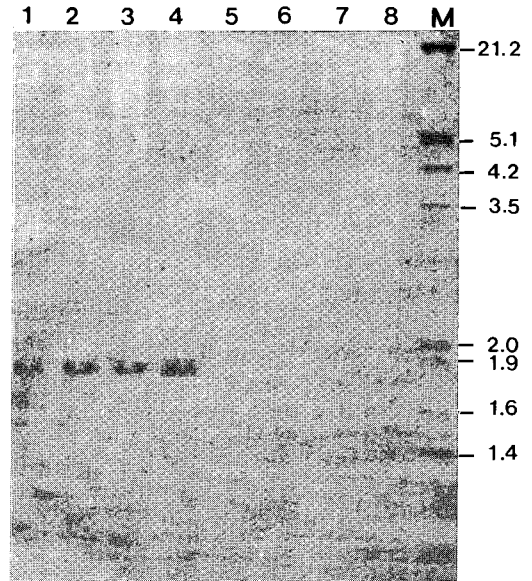


Fig. 4. Southern hybridization of DAZ gene in azoospermic males.
 Lane 1-4, azoospermic males without deletion by PCR
 Lane 5-8, azoospermic males with deletion by PCR
 M, molecular weight marker VIII (Boehringer Mannheim)

평균 나이는 35.7세 이었으며, 고환의 용적은 평균 12/12(좌/우)mL이었으며, 범위는 3mL에서 25mL까지 다양하게 나타났다. 결실을 나타낸 severe OATS 군에서는 평균 15/14.6(좌/우)mL로 나타나 정상인과 차이가 없었으나, 결실을 나타낸 비폐쇄성 무정자증 환자군은 평균 11.5/11.4mL로 정상인에 비하여 감소된 것으로 나타났다. 그리고 Y 염색체 미세결실이 나타난 비폐쇄성 무정자증 남성 불임환자에서 고환의 조직병리학적 소견은 12명중 10명에서 확인할 수 있었는데, Sertoli cell only syndrome이 3명, maturation arrest가 6명, Leydig cell hyperplasia가 1명으로 나타나 다양한 조직병리학적 소견을 나타냈고, 대부분 심각한 정자 형성장애를 나타냈다. 미세결실을 갖는 15명에서 세포유전학적인 핵형 분석은 9명에서 조사되었는데, 6명에서는 정상적인 46XY 핵형을 보였고, 2명에서는 45X/46XY mosaicism을 보였다. 또한 1명의 경우에는 46XX의 핵형의 보였으나, SRY 유전자가 존재하고 있는 것으로 나타났다. Y 염색체 미세결실을 나타낸 15명의 FSH 평균농도는 15.5 ± 8.8 (IU/L)이었으며 범위는 5.7에서 35.0까지 다양하게 나타

Table 2. The rate of Y chromosome microdeletion in azoospermic males according to diagnostic evaluation and STS markers

Diagnosis	Fathered (n=42)	OATS (n=15)	Obstructive (n=30)	Non-obstructive (n=106)
STZ				
DAZ	0	2(13.3%)	0	10(9.4%)
sY129	0	1(6.6%)	0	8(7.5%)
sY134	0	1(6.6%)	0	8(7.5%)
Total microdeletion*	0	3(20.0%)	0	12(11.3%)

* Total numbers of microdeletion more than one STS marker.

Table 3. Clinical characteristics of 15 infertile men showing microdeletions of Y chromosome

Patient No.	Diagnostic evaluation	STS markers				Age	Testes size (mL) ^a	Testes pathology	Karyotype	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	T (ng/mL)
		SRY	DAZ	sY 129	sY 134							
YJ-1	OATS	+	-	+	+	28	14/14	NA	46XY	6.3	4.7	6.5
YJ-2	OATS	+	+	-	-	40	14/14	NA	NA	4.9	7.0	6.1
YJ-3	OATS	+	-	+	+	36	17/16	NA	46XY	6.3	3.3	5.6
YJ-4	Azoospermia	+	-	-	-	36	5/5	Leydig cell hyperplasia	46XY	35.0	23.0	4.5
YJ-5	Azoospermia	+	-	+	+	34	5/5	Sertoli cell only	46XY	12.5	8.0	4.8
YJ-6	Azoospermia	+	+	-	-	35	25/25	maturation arrest	NA	5.7	3.3	4.3
YJ-7	Azoospermia	+	-	+	+	34	10/8	Sertoli cell only	46XY	19.0	7.3	5.0
YJ-8	Azoospermia	+	-	-	-	36	18/18	maturation arrest	NA	10.0	7.9	4.3
YJ-9	Azoospermia	+	-	-	-	44	5/3	NA	45X/46XY	23.0	8.8	4.9
YJ-10	Azoospermia	+	-	-	-	35	8/7	NA	45X/46XY	24.0	11.0	5.6
YJ-11	Azoospermia	+	-	-	-	33	8/8	Sertoli cell only	NA	19.0	10.0	2.0
YJ-12	Azoospermia	+	+	-	-	40	18/20	maturation arrest	NA	7.1	5.6	3.4
YJ-13	Azoospermia	+	-	+	+	36	18/18	maturation arrest	46XY	23.0	8.2	5.4
YJ-14	Azoospermia	+	-	-	-	34	8/8	maturation arrest	NA	16.0	6.7	2.2
YJ-15	Azoospermia	+	-	+	+	35	10/12	maturation arrest	46XY	20.0	13.0	2.8
Mean ± SD						35.7	12 ± 6.0/12 ± 6.4			15.5 ± 8.8	8.5 ± 4.8	4.5 ± 1.4

NA, not available; OATS, oilgoasthenoteratozoospermia; FSH, follicular stimulating hormone; LH, leuteinizing hormone; T, testosterone. ^a Testicular volume, measured by Prader orchidometer, refers to the volumes of the right and the left testis, respectively

났는데, OATS 에서는 평균 5.8IU/L로써 정상치 (1-14IU/L)로 보였고, 비폐쇄성 무정자증 환자에서는 8명에서 정상보다 높은것으로 나타났다. LH의 농도는 OATS에서 평균 5IU/L로써 정상치 (1.5-9.2IU/L)를 보였고, 비폐쇄성 무정자증 환자 1명에서 정상치보다 높았으나, 나머지 환자에서는 정상치와 유사하고 환자간에 변화가 큰 것으로 나타났다. Testosterone의 경우 OATS에서는 평균 6.0ng/mL로써 정상치(2.4-18ng/mL)를 보였으며 비폐쇄성 무정자증 환자에서도 평균 4.1ng/mL로 정상치를 나타냈다.

5. DAZ 유전자의 RNA binding domain에서의 변이

Severe OATS(15명)와 비폐쇄성 무정자증 환자

(106명)에서 DAZ 유전자의 돌연변이를 확인하기 위해 DAZ 유전자의 PCR 증폭산물을 SSCP 분석한 결과 어떠한 SSCP variant도 보여지지 않았다.

고 찰

1988년 Lanzendorf 등에 의해 인간의 불임을 해결하기 위하여 최초로 시도되었던 ICSI는 1992년 Palermo 등에 의해 임신 성공이 보고된 후 불임환자의 수정문제를 해결하는데 매우 유용한 불임치료법으로 이용되고 있다. 정액내의 정자를 분리하여 난자 내에 주입하는 conventional ICSI(Van Steirteghem et al., 1993a; 1993b), 부고환에서 채취된 정자를 이용하는 MESA-ICSI

(Silber et al., 1994), 그리고 생검된 고환의 세정관에서 추출한 정자를 이용하는 TESE-ICSI (Devroey et al., 1995)에서 공통적으로 높은 수정률과 임신율을 나타내 OATS나 폐쇄성 무정자증을 보이는 환자에서 불임의 대부분을 해결할 수 있게 되었다. 또한 ICSI는 최근 남성요인 이외의 원인으로 인한 불임에도 보조생식술로 적용되어 높은 수정률과 임신율을 나타내고 있다(이동률 등, 1996). 그러나 원인불명의 남성불임환자, 고환에서 정자형성 부전을 나타내는 비폐쇄성 무정자증 환자 그리고 심한 OATS 환자에서 불임의 원인이 유전적 요인일 경우 ICSI를 이용한 수정은 불임증을 나타내는 유전형질이 다음 세대로 전달될 수 있다(Reijo et al., 1996).

현재 불임과 관련이 있는 유전자들은 세 군으로 구분할 수 있다. 첫 번째 종류는 생식세포를 형성하는 과정에서 생식세포에서 발현되는 유전자 군이며, 두 번째로는 생식소의 분화와 관련된 유전자군 그리고 마지막으로 체세포에서 발현되며 인간의 생식기능과 밀접한 관계를 갖는 유전자 등이 있으나, 정자의 형성과정에서 생식세포간에 channels 이나 세포간교(intercellular bridge)를 통하여 유전자 발현산물이 이동될 수 있다(Braun et al., 1989). Y 염색체 상에 존재하는 AZF 유전자는 첫 번째 종류인 정자 형성 시 생식세포에서 발현되는 유전자군에 속하며 미세결실이 존재할 경우 ICSI를 통하여 수정과정에서 아들에게 100% 유전된다. 따라서 AZF의 변이에 의한 남성 불임환자에서는 ICSI를 이용한 수정이 재고되어야 한다.

본 연구결과로 볼 때 정상인이나 폐쇄성 무정자증 환자에서 고환내 정자형성은 정상적으로 이루어지며 양성대조군인 fathered male과 폐쇄성 무정자증 환자군에서는 미세결실이 나타나지 않고 비폐쇄성 무정자증 환자나, 심한 OATS 환자군에서 나타난 것으로 보아 이 환자군에서 정자형성 장애는 Y 염색체의 미세결실에 의한 것으로 확인되었다. 또한 Y염색체 내 미세결실의 비율은 본 연구에서 사용하지 않은 다른 부위의 STS marker를 이용하여 분석하였을 때 증가하게 될 것이며, 향후 더 많은 연구가 필요하다. 따라서 Y 염색체의 결실을 분석하는 것은 남성불임의 원인을 진단하는데 있어서 매우 중요하다.

그러나 결실이 발견된 severe OATS 남성 불임 환자에서 소량의 정자가 형성되는 것은, 본 연구

에서 조사된 STS marker 이외의 다른 부위에 존재하는 유전자들이 정자형성과정에 관여하며 여러 종류의 유전자들이 정자형성과정을 조절하는 것으로 볼 수 있다(Vogt et al., 1996). 따라서 Y 염색체의 다른 부위에 존재하는 STS markers를 이용한 AZF의 진단이 필요하며 각 STS marker들에 존재하는 유전자의 기능을 밝히는 것이 필요하다.

본 연구의 각 STS marker에 대한 PCR 증폭산물은 음성대조군에서 증폭되지 않고 DAZ의 Southern hybridization 결과로 보아 Y 염색체 상에 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, severe OATS 환자나 무정자증 남성에서 Y 염색체의 미세결실을 확인하는 과정에서 PCR의 유용성을 증명되고 있다. 결실빈도가 가장 높은 것으로 알려진 DAZ, sY129 그리고 sY134의 STS marker를 사용하여 한국인 무정자증 환자의 Y 염색체 장완의 미세결실을 조사한 결과 15명의 severe OATS 환자, 비폐쇄성 무정자증 환자 106명, 폐쇄성 무정자증 환자 30명 과 fathered male 42명을 분석한 결과(Table 2), OATS에서는 총 3명(20.0%)에서 Y 염색체의 미세결실을 보였으며, 비폐쇄성 무정자증환자 106명중 12명(11.3%)에서 deletion을 보였는데 폐쇄성 무정자증 환자와 양성 대조군에서는 STS marker에서 결실을 보이지 않아 다른 연구자들과 유사한 결과를 나타내고 있다(Reijo et al., 1995; Najmabadi et al., 1996). 그러나 현재 개발되어 널리 이용되고 있는 보조 생식술인 ICSI 방법으로 해결 가능한 군으로 분류하던 OATS군에서도 미세결실이 나타난 것으로 보아 분자유전학적인 진단 없이 OATS군에서 ICSI를 시행하는 것은 재고되어야 할 것이다.

또한 결실이 존재하는 환자군의 고환용적은 정상인에 비하여 낮았으며 Y 염색체상 세 종류의 STS marker 중 한 종류에라도 미세결실이 존재하는 환자의 조직병리학적 소견은 hypospermatogenesis, Sertoli cell only syndrome, maturation arrest로 나타나 비폐쇄성 무정자증 환자의 일반적인 조직소견과 유사한 양상을 나타냈다. 따라서 고환의 일반적인 조직병리학적 소견에 의한 남성불임의 진단은 유전적인 요인을 분석할 수 없을 것이다. 또한 미세결실이 존재하는 환자의 핵형 분석결과 2명은 45X/46XY mosaicism을 나타냈고, 1명은 46XX의 핵형을 가진 남성으로 SRY 유전자가 translocation된 경우를 제외하고 모

두 정상적인 핵형을 나타냈다. 이는 세포유전학적인 핵형 분석으로 정상적인 염색체를 나타내는 환자에서도 Y염색체의 미세결실이 존재할 수 있음을 보여주며, 불임진단 시 Y 염색체의 미세결실을 진단하기 위한 분자유전학적인 방법을 정립해야 할 것이다. 또한 미세결실이 나타난 환자에서 비정상적인 생식소 자극호르몬의 수치를 나타낸 환자는 FSH에서 8명, LH에서 1명으로 나타나, 뇌하수체 기능의 유지와 관계없이 무정자증이 나타남을 보여주고 있으며, steroid hormone의 정상농도를 유지하는 환자에서 결실이 나타난 것으로 보아 내분비 요인과 관계없음을 보여주고 있다.

현재 분자유전학의 발달로 보조생식술 분야에서 유전질환의 이환을 막기 위한 노력이 시도되고 있다. 염색체의 수적, 구조적 이상을 진단하기 위한 FISH(fluorescence in situ hybridization) 방법(Münne et al., 1994; Roh et al., 1996)과 유전자 수준의 이상을 진단하기 위한 PCR 방법(Handyside et al., 1991)을 이용한 preimplantation genetic diagnosis(PGD)가 개발되어 이용되고 있으나 유전자 수준에서 남성불임을 진단하고자 하는 노력은 미진한 상태이다. 여러 연구에 의하면 불임증을 나타내는 유전자들이 보고되고 있고 이를 불임환자에서 진단하는 것은 불임증을 나타내는 자손의 출산을 방지하는데 매우 중요하다. Y 염색체 상에 미세결실이 존재하는 환자에서는 상담을 통하여 착상전 유전진단으로 무정자증을 나타내는 아들의 출산을 방지할 수 있을 것이다. 따라서 남성불임요인 환자에서 ICSI를 이용한 보조생식술을 적용할 경우 Y염색체의 미세결실을 진단하는 것이 필요하며, 미세결실이 진단된 환자에서는 IVF-ET program에서 착상전 유전진단 과정이 필요할 것이다.

결 론

한국인 남성불임환자를 대상으로 불임의 유전적 원인을 조사하기 위하여 남성 불임환자에서 무정자증의 원인별로 Y 염색체의 미세결실 유무를 조사하고, DAZ 유전자의 RNA recognition motif를 구성하는 domain에서의 mutation을 분석하고자 하였다. 연구대상은 비폐쇄성 무정자증 106명, 폐쇄성 무정자증 30명, severe OATS 15명을 대상으로 하였고, 연구에 사용한 STS marker

는 비폐쇄성 무정자증 환자에서 결실 빈도가 가장 높은 STS marker인 DAZ, sY134, sY129를 이용하였다. 각 연구대상 군의 말초혈액에서 genomic DNA를 분리한 후 중합효소 연쇄반응 방법으로 DAZ 유전자, sY129, sY134, SRY 유전자를 증폭하여 분석하고, Southern hybridization 방법으로 DAZ 유전자를 확인하였으며, SSCP 방법으로 DAZ 유전자의 돌연변이를 조사하였다.

결실빈도가 높은 STS marker 3 종류를 분석한 결과, severe OATS 군에서는 15명 중 3명(20.0%)에서 Y 염색체의 미세결실을 보였는데 DAZ 유전자는 2명(13.3%)에서, sY129와 sY134에서는 각각 한 명(6.6%)에서 결실이 나타났다. 또한 비폐쇄성 무정자증환자 106명중 12명(11.3%)에서 미세결실을 보였는데, DAZ의 경우 10명(9.4%)에서 sY134와 sY129의 경우에는 8명(7.5%)에서 결실을 나타냈다. 하지만 폐쇄성 무정자증 환자와 양성대조군인 fathered male에서는 연구에 사용된 모든 STS marker에서 어떠한 결실도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 남성 불임환자에서 불임증을 나타내는 유전자들에 대한 진단은 불임증을 나타내는 자손의 출산을 방지하는데 매우 중요하며, Y 염색체 상에 미세결실이 존재하는 환자에서는 무정자증을 나타내는 아들의 출산을 방지하기 위해 IVF-ET program에서 착상전 유전진단 과정이 필요할 것이다.

인 용 문 헌

- Adham IM, Klemm U, Maier WM, Hoyer-Fender S, Tsaousidou S, Engel W: Molecular cloning of preproacrosin and analysis of its expression pattern in spermatogenesis. *Eur J Biochem* 1989, 182, 563-568.
- Anderson M, Page DC, Pettay D, Subrt I, Turleau C, de Grouchy J, de la Chapelle A: Y;autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45,X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 1988, 79, 2-7.
- Ataya KM, Dudin G, Mroueh, S: Dicentric i(Yq) chromosome and azoospermia. *Am J Med Genet* 1983, 14, 583-590.
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD: Genetically haploid spermatids

- are phenotypically diploid. *Nature* 1989, 337, 373-376.
- Chandley AC, Gosden JR, Hargreave TB, Spowart G, Speed RM, Mcbeath S: Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome (Yqs). *J Med Genet* 1989, 26, 145-153.
- Devroey P, Liu Z, Nagy Z, Toumaye H, Silber SJ, van Steirteghem AC: Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995, 10, 1457-1460.
- Fitch N, Richer C, Pinsky L, Kahn A: Deletion of the long arm of the Y chromosome and review of Y chromosome abnormalities. *Amer J Med Genet* 1985, 20, 31-42.
- Footo S, Vollrath D, Hilton A, Page DC: The Human Y chromosome: Overlapping DNA Clones Spanning the Euchromatic Region. *Science* 1992, 258, 60-66.
- Griffin JE: Androgen resistance: the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 1992, 326, 611-618.
- Handyside AH, Kontogianni H, Hardy K, Winston RML: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990, 334, 768-770.
- Hecht NB: Regulation of 'haploid expressed genes in male germ cell. *J Reprod Fertil* 1990, 88, 679-693.
- Hertig AT, Rock C, Adams CE: Thirty-four fertilized human ova; good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility. A study of biological wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 1959, 23, 202-211.
- Jarvi: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia [letter] *Lancet* 1995, 345, 1578.
- Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z: A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 1988, 49, 835-842.
- 이동률, 윤현수, 백혜란, 심현남, 전종식, 이승현, 조정현, 노성일: Polycystic ovarian syndrome 및 severe endometriosis를 가진 불임환자에서 세포질내 정자주입술에 의한 수정률과 임신률의 증진. *대한불임학회잡지* 1996, 23, 137-143.
- Lovell-Badge R: Testis determination: soft talk and kinky sex. *Curr Opinions Genet Dev* 1992, 2, 596-601.
- Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser J, Speed RM, Thomson E, Jobling M, Taylor K, Wolfe J, Cooke HJ, Hargreav TB, Chandley AC: A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993, 75, 1287-1295.
- Mallidis C, Loveland K, Najmabadi H, McLaughlin R, Baker G, Bhasin S, de Kretser DM: The incidence of the deleted in azoospermia gene in infertile men. Abstracts of the 12th Annual Meeting of the EHSRE. 1996, 56.
- Martin RH, Ko E, Rademaker A: Human sperm chromosome complements after microinjection of hamster eggs. *J Reprod Fertil* 1988, 84, 179-186.
- Mimic M, Mimic S, Babic M, Diklic V: Phenotype of two males with abnormal Y chromosomes. *Clin Genet* 1990, 37, 321.
- Munne S, Weier HG, Stein J, Grifo J, Cohen J: A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Asst Reprod Genet* 1993, 10, 82-90.
- Najmabadi, H. Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, Kretser DM, Baker HWG, Mclachlan RI, Loveland KA, Bhasin S: Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81, 1347-1352.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340, 17-18.
- Roh SI, Kim HJ, Lee DR, Paik HR, Cho JH, Yoon HS: Pregnancy from translocation carrier patient with recurrent abortion by preimplantation

- genetic diagnosis using fluorescence in-situ hybridization. Abstracts of the 52nd annual meeting of ASRM. 1996, 63.
- Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996, 347, 1290-1293.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, Chapella A, Silber S, Page DC: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995, 10, 383-393.
- Silber SJ, Nagy ZP, Liu Z., Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994, 9, 1705-1709.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde M, Van Assche E, Devroey P: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995, 10, 148-152.
- Tesarik J, Mendoza C, Testart J: Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *New Engl J Med* 1995, 333, 525.
- Tiepolo L, Zuffardi O: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976, 34, 119-124.
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde M, Van Assche E, Devroey P: High success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993a, 8, 1055-1060.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993b, 8, 1061-1066.
- Vogt PH: Y chromosome function in spermatogenesis (review). In Nieschlag E, Habenicht UF (eds), *Spermatogenesis-fertilization -contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction. Vol.4.* Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1992, 226-257.
- Vogt PH: Human Y chromosome function in male germ cell development (review). *Adv Dev Biol* 1995, 4.
- Vogt PH, Edelmann A, Hirschmann P, Shan Z, Tenscher S, Urbitsch P: The Y chromosome and (in) fertility in the male. Abstracts of the 12th Annual Meeting of the EHSRE. 1996, 32.
- Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC: The Human Y chromosome: A 43-Interval Map Based on Naturally Occurring Deletions. *Science* 1992, 258, 52-59.
- Yunis E, Garcia-Conti FL, de Caballero OM, Giraldo A: Yq deletion, azoospermia, and short stature. *Hum Genet* 1977, 39, 117-122.