

## 비정상적 정자형성 환자의 정소에서 Heat Shock Protein A2 (hspA2) mRNA 발현의 감소

대진의료재단 분당 제생병원 불임 및 생식의학연구소<sup>1</sup>, 산부인과<sup>2</sup>, 비뇨기과<sup>3</sup>,  
서강대학교 이과대학 생명과학과<sup>4</sup>

손원영<sup>1,4</sup> · 황서하<sup>4</sup> · 한징택<sup>4</sup> · 이재호<sup>1</sup> · 김석중<sup>1,2</sup> · 김영찬<sup>1,3</sup>

### Repression of HspA2 mRNA Expression in Human Testes with Abnormal Spermatogenesis

W.Y. Son, S.H. Hwang, C.T. Han, J.H. Lee, S.J. Kim and Y.C. Kim

Center for Reproduction and Genetics<sup>1</sup>, Department of OB/GYN<sup>2</sup>, Department of Urology<sup>3</sup>,  
Pundang Jesaeng General Hospital, Kyungki-Do, 463-050, Korea,  
Department of Life Science<sup>4</sup>, Sogang University, Seoul, Korea.

#### = Abstract =

**Objective:** Heat shock protein 70-2 (Hsp70-2) gene knockout mice are found to have premeiotic arrest at the primary spermatocyte stage with a complete absence of spermatids and spermatozoa. This observation led to the hypothesis that *hspA2* may be disrupted in human testes with abnormal spermatogenesis. To test this hypothesis, we studied the mRNA expression of *hspA2* in infertile men with azoospermia.

**Design:** The mRNA expression were analyzed by competitive RT-PCR among testes with normal spermatogenesis, pachytene spermatocyte arrest, and sertoli-cell only syndrome.

**Materials and methods:** Testicular biopsy was performed in men with azoospermia (n=15). Specimens were subdivided into three groups: (group 1) normal spermatogenesis (n=5), (group 2) spermatocyte arrest (n=5), (group 3) Sertoli-cell only syndrome (n=5). Total RNA was extracted by Trizol reagent. Total extracted RNA was reverse transcribed into cDNA and amplified by PCR using specific primers for *hspA2* target cDNAs. A competitive cDNA fragment was constructed by deleting a defined fragment from the target cDNA sequence, and then coamplified with the target cDNA for competitive PCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an internal control.

**Results:** On Competitive RT-PCR analyses for *hspA2* mRNA, significant amount of *hspA2* expression was observed in group 1, whereas a constitutively low level of *hspA2* was expressed in groups 2 and 3.

**Conclusion(s):** The study demonstrates that the *hspA2* gene expression is down-regulated in human testes with abnormal spermatogenesis, which in turn suggests that *hspA2* gene may play a specific role during meiosis in human testes.

**Key Words:** Spermatogenic arrest, Testes, *HspA2* gene, Sertoli-cell only syndrome, and Competitive RT-PCR

## 서 론

정자형성 과정은 미성숙된 남성 생식세포로부터 체세포 분열과 감수분열, 그리고 세포 분화의 복잡한 과정을 통하여 정자로 성숙되어 가는 과정을 말한다. 이들 과정 중에 세포의 형태 그리고 기능이 많이 변화하게 되는데 이러한 변화들은 특정 생식세포 발달 시기에 합성되는 단백질의 종류들과 그 발현 양의 변화에 의해 조절된다고 할 수 있다.

불임으로 인해서 고환 조직 검사법을 시행한 환자들 중 약 10~20%에서 정자형성 정지가 관찰된다고 보고 (Meyer 등, 1988)하고 있으며 이러한 정자형성 정지 결과 무정자증으로 나타나게 되는데 그 원인으로 호르몬들의 영향과 염색체 이상 등을 보고하고 있다 (Kretser 등, 1974; Giraldo 등, 1981; Leonard 등, 1979). 인간의 정자형성 정지는 여러 단계에서 발생하는 것으로 보고 (Johnson 등, 1970)되고 있는데 1차 정모세포에서 핵성숙의 정지는 주로 태사기 시기에서 발생하고 있으나 그 생화학적인 기작에 대해서는 아직도 밝혀지지 않고 있다.

많은 heat shock protein 70 (HSP70)군의 단백질들이 남성 생식세포의 발달에 관련이 있다고 보고되어 있는데 HSP70군은 일반적으로 세포질, 미토콘드리아, 소포체 안에서 단백질의 folding, transport, 그리고 assembly를 도와주는 역할을 한다 (Georgopoulos 등, 1993). 생쥐에서, HSP70군 중 두 가지 독특한 HSP70이 정자형성 동안에 발현이 된다고 보고되어 있다. 그것은 태사기 정모세포 단계에서 높은 수준으로 발현하는 P70 단백질 (Allen 등, 1988)과 감수분열 후 정낭세포 단계에서 발현하는 HSC70t 단백질 (Matsumoto 등, 1990)이다. 생쥐 생식세포에서 P70 단백질은 *hsp70-2* 유전자의 산물이라는 것이 밝혀졌으며 (Rosario 등, 1992), 이 유전자는 인간의 *hspA2* 유전자와 아미노산 서열이 98.2%로 동일하여 아마 인간에서는 *hspA2*가 P70 단백질의 유전자일 것이라고 여겨진다 (Bonnycastle 등, 1994).

Dix 등 (1996)은 생쥐에서 *hsp70-2* 유전자를 파괴시키는 gene targeting 방법을 시행하여 웅성 생쥐의 정자형성이 1차 정모세포에서 정지되었음을 보고하여 이 *hsp70-2* 유전자가 정자형성 정지와 관련이 있음을 직접적으로 증명하였다. 따라서 우리는 인간의 정자형성 정지에서도 생쥐의 *hsp70-2*

유전자와 거의 동일한 인간의 *hspA2* 유전자의 발현이 손상되었을 가능성을 생각할 수 있었다. 이것을 연구하여 보기 위하여 competitive RT-PCR 방법을 적용하여 정자형성이 정상적으로 일어나는 정소들과 정자형성이 정지된 정소들에서 *hspA2* mRNA의 발현을 비교하여 *hspA2* 유전자가 인간의 정자형성에서 중요한 역할을 한다는 것을 알고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Testes 조직의 준비

불임을 원인으로 내원한 환자들 중 무정자증으로 판명된 환자에게 고환 조직검사를 시행하였다. 고환 생검은 국소 마취로 시행하였으며, 고환 생검시 얻은 조직의 일부는 병리검사를 위해 Bouin's 용액에 고정하여 파라핀 포매를 시행하였고, 일부 조직은 RNA 연구를 위해 즉시 액체 질소에 담가 실험 때까지 냉동보관 하였다. 정자형성 정지 여부는 병리학자에 의해 판정하였다. RNA 연구를 위하여 정상 정자형성이 일어나는 5개의 고환 조직 (group 1), 정자형성이 태사기 정모세포에서 정지된 5개의 고환 조직 (group 2), 그리고 씨토리 세포 증후군 고환 조직 5개 (group 3)를 실험에 공시하였다.

### 2. Total RNA의 준비

Total RNA는 상업적으로 개발된 시약 (Gibco BRL, USA)에 있는 방법에 따라서 회수하였다. 각 고환 조직을 glass tissue grinder에서 1 ml의 Trizol 용액을 넣고 균질액을 얻을 때까지 균질화 시켰다. 이 균질액을 신선한 eppendorf tube에 넣고 5분 동안 incubation 시켰다. Chloroform을 tube에 부가한 후 samples을 4℃, 12,000 g에서 20분 동안 원심 분리 하였다. 윗 용액을 신선한 tube로 옮긴 후 1 vol의 isopropanol을 부가하였다. 10분 동안 incubation한 후 RNA 침전물을 4℃, 12,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 얻었다. 침전물은 75% 알코올에서 세척 후 짧게 말렸다. 그 RNA 침전물을 20 µl의 DEPC-처리된 멸균된 물에 용해하였다. 농도를 측정하기 위하여 용해된 sample 2 µl를 DEPC-처리된 멸균된 물에 600 µl로 희석시킨 후 분광분석기로 OD260에서 측정하여 그 농도를 결정하였다. 남아있는 DNA는 DNase I (Gibco BRL, USA)으로 처리하여 제거하였다. 얻어진 RNA는 즉시 사

용하거나 나중에 사용을 위하여 -70°C deep freezer에 보관하였다.

### 3. Competitive RT-PCR을 위한 competitor의 제조

*HspA2* gene의 mRNA 발현 정도를 연구하기 위하여 우리가 선택한 primers에 의해서 합성되는 부분은 그 cDNA 산물 (3106-3448)의 크기가 343 bp로서 인간의 일반적인 *hsp70* gene과 homology가 적은 3' untranslated region (UTR)의 한 부분이다 (Fig. 1. Schematic diagram). *HspA2* gene의 343 bp cDNA 산물은 전체 고환 RNA의 RT-PCR 증폭에 의해 얻어졌다. 이 RT-PCR 증폭물은 pMOSBlue vector (Amersham, USA)로 cloning하여 pDMC1 plasmid를 얻었다. pMOSBlue vector에 들어간 343 bp의 방향과 sequence는 DNA sequencing에 의해 확인하였다. Competitor인 cDNA deletion mutant는 다음과 같이 준비하였다. pDMC1 vector에 들어가 있는 343 bp의 산물을 PCR 방법으로 다량 얻었다. 이 산물을 정제한 후 *Mse* I 제한효소로 잘랐다. *Mse* I의 자른 cDNA 조각들을 정제 없이 T4 DNA ligase로 ligation한 후 pMOSBlue vector에 cloning 하였다. Mutant cDNA를 포함하는 bacterial clones은 plasmid DNA (pDMC2)의 PCR 증폭에 의해 확인하였다. *HspA2*의 deletion mutant cDNA는 그 크기가 200 bp이었다. Internal control mRNA는 GAPDH 유전자를 사용하였는데 sense primer의 sequence는 5'-cggagtcaacggatttggctgat-3'이었고 antisense primer는 5'-agccttctccatgggtggaagac-3'이었다. GAPDH 유전자의 RT-PCR 산물의 크기는 306 bp이다.

### 4. Reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR)

역전사 반응은 *hspA2* gene의 특정부위에 대한 antisense primer로 annealing하여 시행하였다. Total RNA 5 µg을 2 pmol의 증폭하고자 하는 mRNA의 antisense primer와 internal control GAPDH mRNA의 antisense primer의 존재하에서 65°C에서 10분 동안 denaturation 시켰다. 4°C에서 짧게 원심분리한 후 7 µl의 master mix [10X RT buffer, 1 µl dNTP mix (2.5 mM each), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dithiothreitol]을 부가한 후 42°C에서 5분 동안 pre-warmed 하였다. Reverse transcriptase (AMVE, Promega)를 부가한 후 42°C에서 50분 동안 incubated하였다. 역전사 반응은 온도를 65°C에서 15분 동안 incubation

하여 정지시켰다. Competitive PCR을 위하여 cDNA mutant를 PCR 반응 전에 부가하였다. PCR 증폭은 역전사 sample 2 µl을 사용하여 5 µl 10X PCR buffer, 2.5 µl dNTP mix (2.5 mM each), 그리고 0.5U의 Taq polymerase와 10 pmol의 PCR primers를 첨가하여 전체 50 µl 반응 mixture로 하여 증폭시켰다. PCR은 94°C에서 1분, 58°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초 동안 진행시키는 cycle로 35 cycle 실행하였고 마지막에 72°C에서 10분 동안 시켰다. 역전사 sample 2 µl aliquots는 internal control GAPDH의 primers로 같은 PCR 조건으로 분리된 tube에서 증폭시켰다. RT-PCR 산물들을 2% agarose에서 전기영동하여 분리, EtBr로 염색한 후 UV하에서 gel video image로 사진을 촬영하여 band의 농도를 software program으로 분석하였다.

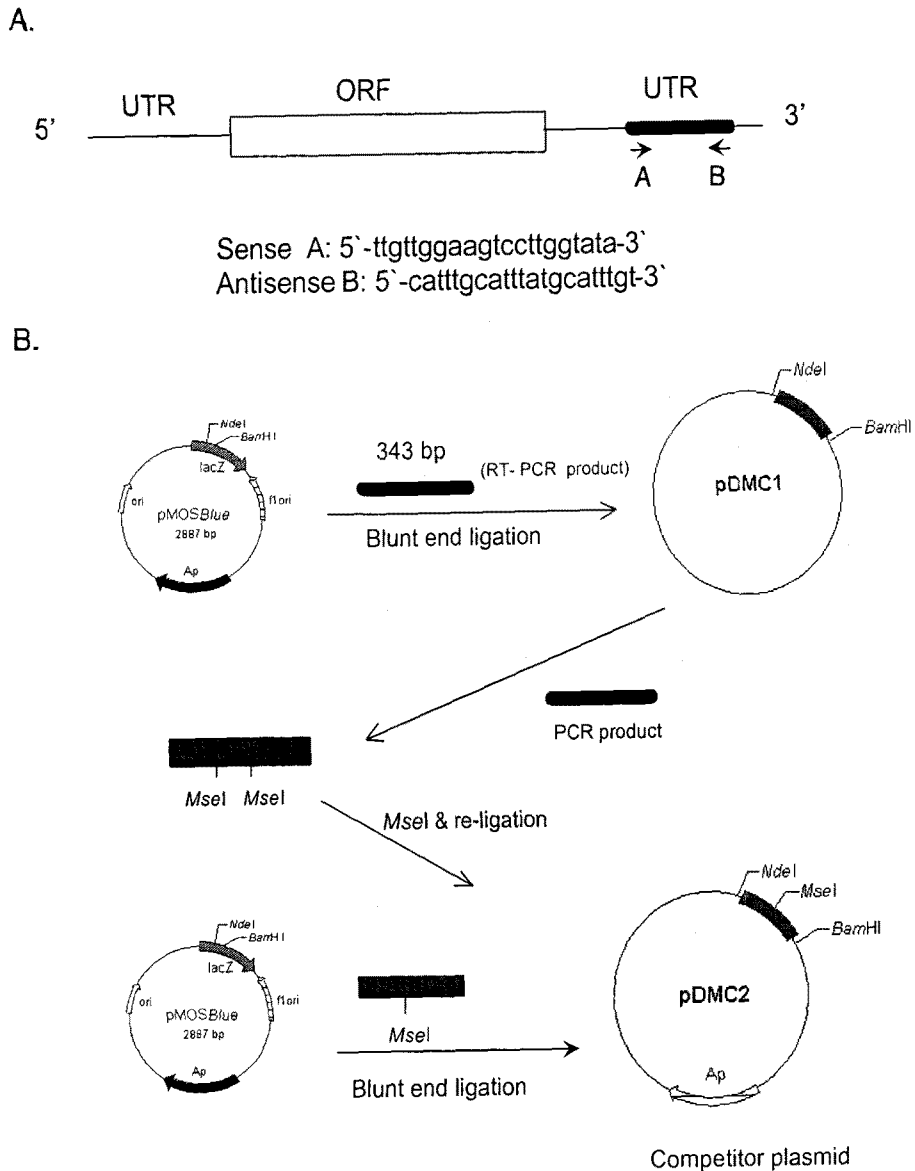
## 결 과

### 1. Histological evaluation of testes

Fig. 2는 각 환자군의 정소 조직을 병리학적으로 판단한 hematoxylin/eosin 염색을 나타낸 그림이다. (A)는 정상적으로 정자형성이 일어나는 환자의 정소 조직을 보여 주는 것으로 폐쇄성 무정자증 환자임을 나타내어 준다. (B)는 정자형성이 1차 정도 세포의 태사기 단계에서 정지된 것을 보여주며 그림 (C)는 생식세포가 전혀 나타나지 않는 씨토리 세포 증후군 환자의 정소 조직을 보여준다.

### 2. Competitive RT-PCR

Fig. 3은 각 군의 고환 조직에서 시행한 competitive RT-PCR을 나타내었다. Internal control로 GAPDH를 사용하였으며 그 RT-PCR 산물은 3군들 모두에서 차이가 없었다 (Fig. 3, A). 그러나 정모세포에서 정자형성이 정지된 군 (Fig. 3, C)이나 생식세포가 존재하지 않는 씨토리 세포 증후군 (Fig. 3, D)의 정소 조직에서 *hspA2* 유전자의 RT-PCR 산물은 정상적으로 정자형성이 일어나는 군 (Fig. 3, B)에 비해 현저하게 떨어졌다. 그 상대적인 발현을 도표로 비교하여 보았다 (Fig. 3, E). 씨토리 세포 증후군 환자의 정소에서도 약간의 mRNA의 발현을 볼 수 있는데, 따라서 이 유전자가 constitutive level로 발현은 되지만 특히 정소의 생식세포에서 주로 많이 발현된다는 것을 알 수 있다 (Fig. 3, B).



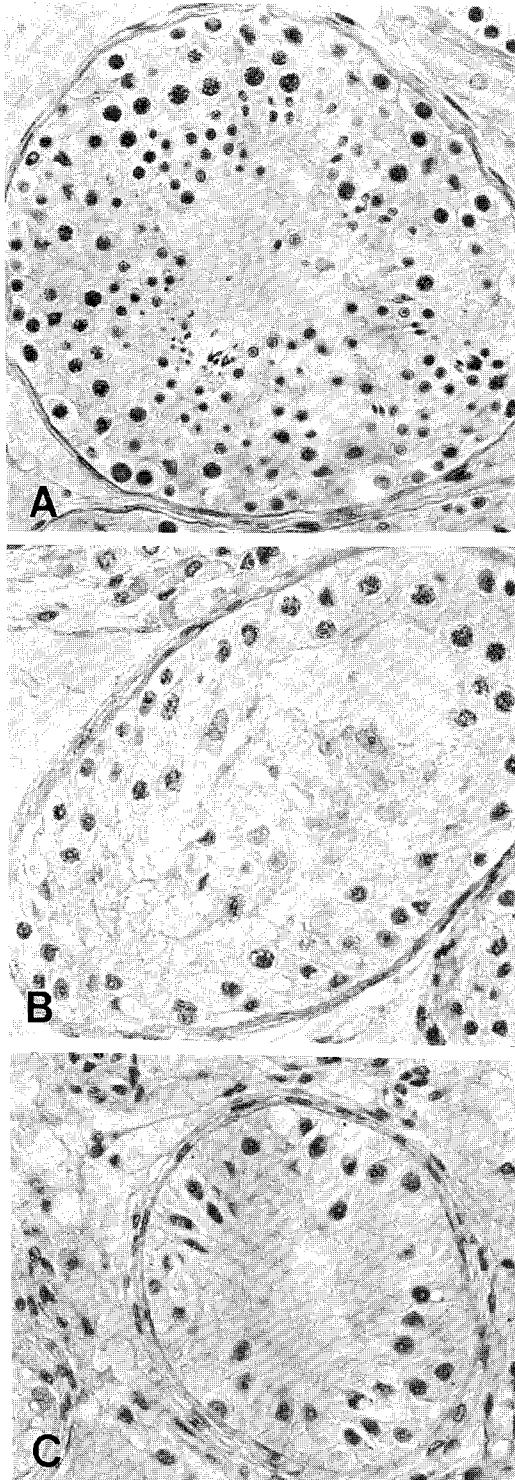
**Fig. 1. A:** Schematic diagram of *hspA2* gene, and its primer sequences. Open box represents open reading frame (ORF) and straight lines represent untranslated regions (UTR). **B:** Schematic diagram for competitor plasmid construction, pDMC2.

## 고찰

우리는 본 실험을 통하여 인간의 정자형성이 정지되었거나 생식세포가 없는 씨토리 세포 증후군의 정소 조직의 경우 인간의 *hspA2* 유전자의 발현이 정상적인 정자형성이 일어나는 정소 조직에

비해 현저하게 떨어지는 것을 알았으며 이를 통하여 인간의 정자형성에서 *hspA2* 유전자가 어떤 중요한 역할을 할 것이라는 것을 알 수 있었다.

Allen 등 (1988)은 생쥐의 정자형성 과정에서 heat shock에 의한 stress에 의하지 않고도 계속적으로 발현이 되는 단백질을 동정하였으며 그 단백질을 P70으로 명명하였다. 또한 생식세포들을



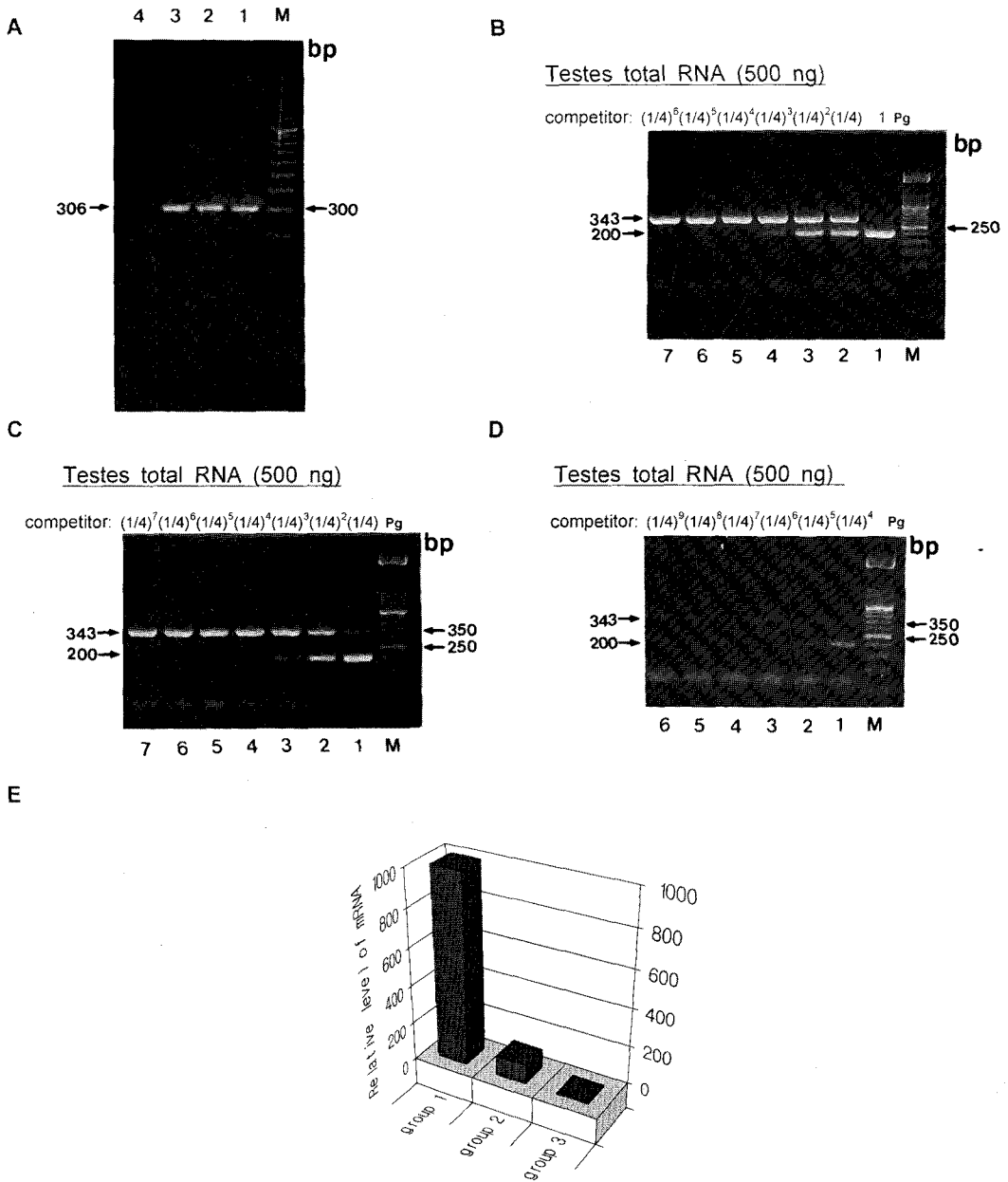
**Fig. 2.** Hematoxylin/eosin stains; (A) normal spermatogenesis, group 1; (B) spermatogenic arrest, group 2; (C) Sertoli-cell only syndrome, group 3. (X200)

각 단계별로 분리하여 P70 단백질이 세포의 분화 과정 중 태사기 정자형성 단계에서 특이하게 가장 많이 발현된다는 것을 보고하였다 (Allen 등, 1988). 같은 연구팀의 Rosario 등 (1992)은 P70 단백질이 *hsp70-2* gene의 산물임을 확인하였고, 생식세포와 체세포의 다른 heat shock 단백질과 결합하지 않는 P70 단백질에 대한 antiserum 2A를 얻어 western blot 방법으로 이를 증명하였다. P70 단백질이 웅성 생쥐의 정자형성에 중요하게 작용할 것이라는 직접적인 증거는 같은 연구팀의 Dix 등 (1996)의 연구에 의해 밝혀졌는데 그들은 gene targeting 방법으로 *hsp70-2* 유전자의 발현을 제거했을 때 자성 생쥐는 이상이 없었으나 웅성 생쥐는 정자형성이 1차 정모세포 단계에서 정지되고 불임을 유발함을 보고하였다.

생쥐 등 설치류의 정자형성에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으나 인간의 정자형성에 대한 연구는 여러 가지 문제로 인하여 아직 그 결과가 미미하다. 따라서 위의 설치류를 통한 연구들을 우리는 인간의 정자형성을 연구하는데 적용하여 보았다. 인간은 gene disruption 방법을 사용할 수 없으므로 남성 불임으로 내원한 무정자증 환자를 대상으로 비정상적인 정자형성이 일어난 정소를 병리학자에 의해 확인하였고 그 정소 조직이 생쥐의 연구에서처럼 *hsp70-2*의 유전자의 발현과 관련이 있는지를 확인하여 보기 위하여 정상적으로 정자형성이 일어나는 군에서 *hspA2* 유전자의 발현과 비교하여 보았다.

인간의 *hspA2* 유전자는 Fig. 1에서 보듯이 1917 bp의 1개의 open reading frame을 가진 유전자이며 예상되는 단백질의 분자량은 70,030 Da이다 (Bonnycastle 등, 1994). 이 유전자는 설치류의 *hsp70-2* 유전자와 98.2%, 다른 인간의 heat shock 유전자인 *hsp70-1* 유전자와 83.3%, 그리고 인간 *hsc70* 유전자와 86.1%의 아미노산 배열의 동일성을 가지고 있다. 따라서 우리는 인간의 다른 유사한 heat shock 유전자와 염기 서열의 유사성이 적은 3'말단의 untranslated 부분을 RT-PCR 증폭하도록 특정 primers를 제작하였다. 그리고 그 부분이 제대로 증폭되었는지 확인하기 위하여 vector에 cloning하여 염기서열 비교, 분석으로 확인하였다. 이 증폭된 부분은 설치류의 *hsp70-2*와 100% 핵산 서열이 일치하는 부분이다.

Bonnycastle 등 (1994)은 *hspA2* 유전자의 발현이 거의 모든 인간의 조직에서 constitutive 하게 발현



**Fig. 3.** Competitive RT-PCR analysis for *hspA2* transcripts; or internal control GAPDH (A) lane 1; normal spermatogenesis, lane 2; spermatogenic arrest, lane 3; Sertoli-cell only syndrome, lane 4; no RT control. For competitive RT-PCR; (B) normal spermatogenesis, group 1; (C) spermatogenic arrest, group 2; (D) Sertoli-cell only syndrome, group 3; (E) Relative level of mRNA.

이 되는데 특히 정소에서 유의차 있게 많이 발현됨을 관찰하였다. 그러나 난소에서의 발현은 다른 인간의 조직에서의 발현과 유사하였다. 따라서 우리는 *hspA2* 유전자가 생쥐의 *hsp70-2* 유전

자와 같이 남성의 생식세포에서 특별히 중요한 기능을 할 것이라고 생각이 되어졌고 본 실험을 통하여 그것이 확인이 되었다. 즉, 남성의 생식세포가 없는 씨트리 세포 증후군을 가진 정소 조직

은 정상 정소 조직에 비해 낮은 level로 *hspA2* 유전자가 발현되었다. 따라서 정소의 생식세포에서 *hspA2* 유전자가 특히 많이 발현이 되며, 정자형성이 정지된 환자 정소의 *hspA2* 발현이 정상적으로 정자형성이 일어나는 정소 조직에 비해 유의하게 떨어지는 결과를 통하여 *hspA2* 유전자가 인간의 정자형성에서 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

우리는 *hspA2* 유전자의 발현이 떨어지는 이유를 크게 3가지 방향으로 연구를 진행중이다. 첫째는 *hspA2* 유전자의 open reading frame 부분의 돌연변이 여부에 대해서 연구중이고, 두번째는 이 유전자를 조절하는 promoter 부위의 돌연변이 여부에 대해서 연구중이고, 그리고 *hspA2* 유전자의 transcription을 조절하는 transcription factor들의 문제 여부에 대해서 연구를 진행중이다. 이 연구가 이루어지면 남성의 생식세포가 없거나 생식세포의 분화가 정지된 것이 *hspA2* 유전자의 발현이 억제되어 나타나는 현상인지 아니면 생식세포 결핍과 분화의 정지로 인해 *hspA2* 유전자의 발현이 억제되는 것인지를 알 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

결론적으로, 정자형성이 정지된 정소 조직이나 생식세포가 없는 씨토리 세포 증후군의 정소 조직들이 정상적으로 정자형성이 일어나는 정소 조직에서보다 *hspA2* mRNA의 발현이 현저히 억제되어 있었다. 이것은 *hspA2* 유전자가 인간의 정자형성에서 생식세포가 발달하고 분화하는데 어떤 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 인간의 정자형성 과정에서 *hspA2* 유전자의 기능을 밝히기 위해서는 그 유전자의 산물인 P70이 생식세포 내에서 어떻게 작용을 하는지를 규명하는 생화학적인 연구가 필요할 것이라고 생각된다. 또한 *hspA2* 유전자의 발현과 관련된 다른 요인들, transcription factor들 그리고 유전자 변이 등에 대한 연구도 병행되어야 한다고 생각된다.

## 인 용 문 헌

Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM: A novel hsp70-

- like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Mol Cell Biol* 1988, 8, 828-32.
- Bonnycastle LLC, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, *et al.*: Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSP A2). *Genomics* 1994, 23, 85-93.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poonman-Allen P, *et al.*: Targeted gene disruption of HSP70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *PNAS* 1996, 93, 3264-8.
- Georgopoulos C, Welch WJ: Role of the major heat shock protein as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 1993, 9, 601-34.
- Giraldo A, Silva E, Martinez I, Campos C, Guzman J: Pericentric inversion of chromosome 1 in three sterile brothers. *Hum Genet* 1981, 58, 226-7.
- Johnson SG: Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970, 1, 2-15.
- Kretser DM de, Burger HG, Hudson B: The relationship between germinal cells and serum FSH levels in males with infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1974, 38, 787-93.
- Leonard C, Bisson JP, David G: Male sterility associated with familial translocation heterozygosity: t (8; 15) (q22; p11). *Arch Androl* 1979, 2, 269-75.
- Matsumoto M, Fujimoto H: Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 166, 43-9.
- Meyer JM, Roos M, Rumpler Y: Statistical study of a semiquantitative evaluation of testicular biopsies. *Arch Androl* 1988, 10, 71-9.
- Rosario MO, Perkins SL, O'Brien DA, Allen RL, Eddy EM: Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Devel Biol* 1992, 150, 1-11.