

## 한국 남성 불임환자에서 Y 염색체상의 AZF Gene에 대한 분석 및 DAZ Gene의 발현 양상

삼성제일병원 제일의학연구소 불임연구실, 비뇨기과<sup>1</sup>

이호준 · 이형송 · 송건지 · 변혜경 · 서주태<sup>1</sup> · 김종현<sup>1</sup> · 이유식<sup>1</sup>

### Analysis of the Azoospermia Factor (AZF) Gene on Y Chromosome and Expression Pattern of DAZ Gene in Korean Infertile Men

Ho-Joon Lee, Hyoung-Song Lee, Gyun-Jee Song, Hye-Kyung Byun, Ju Tae Seo<sup>1</sup>,  
Jong Hyun Kim<sup>1</sup> and You Sik Lee<sup>1</sup>

*Infertility Research Laboratory, Department of Urology<sup>1</sup>,  
Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center, Seoul, Korea*

#### =Abstract=

Cytogenetic observations of loss of the distal portion of the Y chromosome long arm were found to be associated with disrupted spermatogenesis. The existence of a gene involved in the regulation of spermatogenesis, the azoospermia factor (AZF), was postulated. In this study, we screened the AZF region including DAZ and DAZH genes and observed the expression pattern of DAZ and DAZH transcript in infertile men with azoospermia and oligospermia by using a sequence-tagged site (STS)-based PCR method. PCR primers were synthesized for 11 STSs that span Yq interval 6, SRY, DAZ, and DAZH, functional DAZ homologue on chromosome 3. Microdeletions were detected in 4/32 (12.5%) azoospermic men and 1/11 (9%) severe oligospermic men. Only 2 of 5 patients had microdeletions of Yq that contained the DAZ gene, whereas the other 3 patients had deletions extending from intervals 5L-6F proximal to the DAZ gene on Yq. Testis biopsies of the azoospermic patients revealed a variety from Sertoli cell-only syndrome to testicular maturation arrest. Of 4 men with clinical data available, average testis size was R: 13.8 cc, L: 13.8 cc, serum T was  $4.0 \pm 1.25$  ng/ml, LH was  $3.63 \pm 1.90$  mIU/ml, and FSH was  $8.85 \pm 5.13$  mIU/ml. These values did not differ significantly from the remainder of the patients tested. We could not observe the DAZ transcript in 2 patients, who have no mature spermatozoa. In 11.6% of patients microdeletions of the AZF could be detected. These deletions in the AZF region seem to be involved causing spermatogenic failure. But the frequency of microdeletions proximal to DAZ suggests that DAZ is not the only gene associated with spermatogenic failure.

#### 서 론

사람의 정자는 정소에서 여러단계의 복잡한 발생과정을 거쳐 생산되어지며, spermatogonial stem

cell로부터 성숙한 정자가 되기까지는 약 65일이 걸린다 (Clermont, 1966; Dym, 1994). 이런 과정은 적어도 3번의 유사분열과 2번의 감수분열을 거쳐 완성되는데 정자형성과정은 호르몬의 영향에 의해 생리적인 기작이 이루어지는 사춘기 때 시

작하여 일생동안  $10^{12} \sim 10^{13}$  마리의 정자를 생산하게 된다.

정자형성과정에 있어서의 심한 장애 때문에 성인 남성 중 2%가 불임으로 판명되었으며, 이들 중 대부분은 건강상 다른 문제점을 찾아볼 수 없었다. 그러나 이런 비정상적인 정자형성의 원인은 아직 확실하게 밝혀지지 않았다 (Hull *et al.*, 1985; Silber, 1989). 이러한 불임의 원인으로는 감염, 면역학적 요인, 해부학적 기형, 또는 화학적 요인 등에 기인한다고 알려져 있으며, 정자형성 과정에는 많은 유전 단백질이 필요하지만 아직까지 분자 수준에서 정자형성과정을 방해하는 어떠한 변이도 밝혀지지 않았다. 정자 생산에 관여하는 유전자의 확인 - 돌연변이 표현형의 분석 - 은 이런 발생 과정에 대한 이해와 남성 불임의 치료에 대한 기본적인 이론을 제공하여 줄 것이다.

정자형성과정에 있어서의 유전자 연구의 주된 대상은 Y 염색체이며 이의 역할은 Tiepolo와 Zuffardi (1976)에 의해 처음 주장되었다. 이들은 1170명의 불임 환자를 분석해 본 결과 6명의 무정자증 환자에서 Y 염색체 장완의 미세결실이 관찰되었다고 보고하였다. 이 결과를 기초로 하여 Tiepolo와 Zuffardi는 Y 염색체 장완에 정자형성에 중요한 역할을 하는 요소, 즉 *Azoospermia Factor* (AZF)의 존재를 제안했으며 또한 무정자증 환자의 염색체 검사 결과 Y 염색체 장완의 결실과 또한 다른 구조적 이상을 관찰하였다. 무정자증 혹은 회소정자증 남성의 Yq에서의 비정상적인 세포유전학적 소견은 정자형성과정을 조절하는 유전적 요소가 Yq11에 존재하리라는 것을 추측케 하였으며 (Tiepolo L and Zuffardi O, 1976; Sandberg, 1985), 그들은 그 유전적 요소를 AZF (i.e. azoospermia factor; Tiepolo L and Zuffardi O, 1976)로 정의했다. Y 염색체/상염색체 translocation이 관찰되거나 Yq에 큰 결실을 나타내는 남성에 대한 연구결과 Y 염색체의 euchromatin 모든 부위가 정상적인 생식세포 발달에 필요하다고 보고된 바 있으며 (Vergnaud *et al.*, 1986), karyotyping에 의해 탐지될 수 있을 정도의 결실을 지닌 남성은 무정자증 환자라는 관찰도 있었다. 이러한 관찰은 남성 불임과 연관된 하나의 유전자 혹은 여러 유전자가 Y 염색체 장완 deletion interval 6에 위치할 것이라는 가정을 더욱 확실하게 하였다 (Bhasin *et al.*, 1994; Burgoyne, 1987; Chandley and Cooke, 1994).

남성의 정자형성 조절에 관여하리라고 생각되어지는 여러 유전자 중에는 Y 염색체 장완, 특히 deletion interval 6에 있는 유전자가 현재까지 가장 확실시 되고 있다 (Bhasin *et al.*, 1994; Burgoyne, 1987; Chandley and Cooke, 1994). 이 부분, 즉 Yq 11.23에 있는 유전자가 정자형성에 중요한 역할을 할 것이라는 여러 증거들이 보고되고 있으며 (Bhasin *et al.*, 1994), Yq11의 AZF 위치는 다른 여러 실험실의 세포유전학적 수준 (Yunis *et al.*, 1977; Chandley *et al.*, 1989)과 분자생물학적 수준 (Ma *et al.*, 1992)에서 확인되었다. 그러나 AZF 유전자의 구조와 그의 기능은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않고 있다.

AZF를 밝혀내기 위한 노력으로 처음 수행된 것은 AZF의 위치가 Yq11의 proximal과 distal 부분 사이에 존재한다는 것이었다 (Ma *et al.*, 1992; Vogt *et al.*, 1992). 이러한 proximal과 distal 미세결실은 서로 겹쳐있지 않았기 때문에 AZF locus는 Yq11.23의 interval 5와 6에 존재하는 매우 크거나, 하나의 유전자 이상 혹은 하나의 유전자 집단으로 정자형성과정에 관여할 것이라 생각되었다. Tiepolo와 Zuffardi (1976)의 정자형성에 관여하는 *Azoospermia Factor* (AZF)의 존재를 제안한 이후 Ma 등 (1992)이 DNA probe를 이용한 실험에서 Y 염색체 장완 특히 interval 6의 미세결실을 보고함으로써 AZF의 존재를 확실히 알게 되었으며 AZF를 밝혀내고자하는 여러 연구가 진행되는 가운데 Ma 등 (1993)은 interval 6에 존재하는 유전자를 찾아내었다. 이 유전자는 *YRRM1*과 *YRRM2*으로서 RNA recognition motif를 가지고 있으며 초기 정자형성과정에 있어서 RNA processing이나 translational control의 기능을 할 것이라 추측되었다. 그러나 *YRRM1*과 *YRRM2*의 기능은 확실하게 밝혀지지 않았으며 Y 염색체의 여러 곳에 존재하고 있어 AZF로서의 의문이 제기되고 있는 가운데 Reijo 등 (1995)은 89명의 무정자증 환자를 대상으로 실험한 결과 12명에서 미세결실을 관찰할 수 있었으며, 이들의 미세결실이 Ma 등이 보고한 *YRRM1*과 *YRRM2*와는 무관하다는 것을 밝혀내면서 정자형성과 관련이 있는 새로운 유전자인 *Deleted in Azoospermia* (DAZ)를 보고하였다. 이 DAZ 유전자는 *YRRM1*과 *YRRM2*와 마찬가지로 RNA binding motif를 갖는 단백질로서 고환에서만 특이적으로 발현되는 단백질을 밝혀내었다. 그 후 Reijo 등 (1996)은 무정자증이 아

닌 회소정자증 환자에서도 Y 염색체의 미세결실을 관찰하여 AZF가 정자형성과정 후기에 관여할 것이라 제안하였다. 이러한 분자유전학적인 접근 방법을 이용하여 DAZ가 사람에게 있어서의 AZF라고 보고된 이후 초파리에서도 DAZ와 상동성을 갖는 유전자, *boule*를 찾아내었으며 (Eberhart *et al.*, 1996). 이 *boule* 유전자도 역시 RNA binding domain을 가지고 있고 정소에서만 발현되며 meiotic G2/M transition을 방해하는 것으로 밝혀졌다. 또한 비슷한 시기에 생쥐에서도 정자형성과정과 관련이 있는 유전자인 *Dazla* (Daz like, autosomal, Cooke *et al.*, 1996)와 *Dazh* (DAZ homolog, Reijo *et al.*, 1996)가 확인되었다. 이 유전자 또한 RNA binding motif를 가지고 있으며 정소에서만 발현이 되는 것으로 관찰되었다. 초파리와 생쥐에서 확인된 각 유전자들은 사람의 DAZ와는 달리 상염색체가 아닌 상염색체에 위치하고 있어 정자형성과정에 있어서 상염색체 상의 RNA binding 단백질의 역할에 대해 논의가 이루어지고 있다. 이렇게 상염색체에서 정자형성과 관련된 유전자가 밝혀지고 있는 가운데 사람에서도 DAZH (Saxena *et al.*, 1996)가 상염색체 3번에 위치하고 있다는 것을 밝혀내어 사람의 정자형성과정이 Y염색체외에도 복합적인 여러 가지 요인들에 의해 조절된다는 것을 알게 되었으며 불임의 원인과 유전적 요인과의 관계를 접합시켰다.

이러한 분자생물학적, 분자유전학적 연구에 힘입어 남성불임 분야에 활발한 연구가 진행되고 있으며 현재까지 비폐쇄성 무정자증 환자의 약 13%가 Y 염색체상의 AZF 결실에 의한 것이라는 보고가 있다 (Reijo *et al.*, 1995). 본 실험에서는 Y 염색체 장완에 있는 미세결실을 탐지하는 방법인 STS-based mapping strategy를 이용한 PCR 방법으로 한국인 남성 불임환자를 대상으로 하여 Y 염색체의 미세결실 정도를 조사하고, AZF로 제안되어온 DAZ와 DAZH의 발현 양상을 교환조직에서 관찰하여 정자형성과정과의 상관관계를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

연구 대상은 1996년 9월부터 1997년 1월까지 삼성제일병원에 내원한 남성 불임환자 중 정액 검사 결과 무정자증이나 회소정자증으로 판명된 환자 43명 (비폐쇄성 무정자증 32명, 회소정자증 11명)과 교환 조직을 획득할 수 있었던 21명 (비폐쇄성 무정자증 20명, 회소정자증 1명)을 대상으로 하였으며 음성 대조군으로는 여성을, 양성 대조군으로는 fathered male을 대상으로 하였다.

### 2. STS primer

Y 염색체의 미세결실 분석을 위해 사용한 prim-

Table 1. Primer sequences of Y-chromosome STSs analyzed

STS	Forward	Reverse
sY129	AgCTTCAGgAggTTCAAAAC	AAgTgggACCTAAgCTACgA
sY134	gTCTgCCTCACCATAAAAACg	ACCACTgCCAAAACTTTCAA
sY147	TTTCTCgTTTgATgATCCTAg	TTAATATgAgAATgAgAACAgATgT
sY148	AAATgAAAAAAgATACgAAACTCg	gAATCCCAccCAAgAATCTg
sY152	AAgACAgTCTgCCATgTTTCA	ACAggAgggTACTTAgCagT
sY156	AggAACTggCaggATTAgCC	ATgTCAgggTTTCCTTTgCC
sY254	gggTgTTACCAgAAggCAAA	gAACCGTATCTACCAAAGCagC
sY255	gTTACAggATTcggCgTgAT	CTCgTCATgTgCagCCAC
sY277	gggTTTTgCCTgCATACgTAATTA	CCTAAAAgCAATTCTAAACCTCCAg
sY283	CAgTgATACACTCggACTTgTgTA	gTTATTTgAAAAgCTACACggg
sY269	CTCTgggACAAGTgTTCCTTg	CATTggCATgAATgTgTATTCA
DAZ	gACCACACAgCTAgAgCACC	gACTgTATCCTTCggATTCC
DAZH	ggAgCTATgTTgTACCTCC	gTgggCCATTTCCAgAggg
SRY	gAATATTCcCGCTCTCCggA	gCTggTgCTCCATTCTTgAg

ers는 Vollrath 등 (1992)과 Reijo 등 (1995, 1996)에 의해 보고된 여러 primers 중에서 비폐쇄성 무정자증 환자에서 결실 빈도가 높은 sY129, sY134, sY147, sY148, sY152, sY156, sY254, sY255, sY277, sY283, sY269를 사용하였다 (Table 1). 고환 조직에서의 DAZ와 DAZH의 발현 양상을 관찰하기 위하여 DAZ에 특이적인 primer를 제작하였으며 DAZH primer는 Saxena 등 (1996)이 사용한 primer를 사용하였다. 또한 남성과 PCR 반응의 양성 대조군으로 SRY 유전자를 사용하였다. 이들 각 primer 쌍들은 Gynosys (USA)에 의뢰 합성하였다.

### 3. Genomic DNA와 고환 조직 RNA의 분리

#### 1) Genomic DNA의 분리

환자의 말초혈액을 항응고제가 처리된 vacuum tube에 채취한 후 3000 rpm으로 원심분리하여 buffy coat만을 분리하여 -70℃에 보관하였다. Genomic DNA는 QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)를 이용하여 추출하였으며 추출한 DNA는 4℃에 보관하였다.

#### 2) RNA의 분리

환자로부터 채취한 조직은 즉시 -70℃에 넣어 냉동보관하였으며 RNA 분리시 Trisol solution (Gibco BRL, USA)을 사용하였다. 순수한 RNA만을 얻기 위하여 DNase I을 37℃에서 1시간 처리하여 genomic DNA를 제거한 후 phenol 추출을 하였고 수용액층을 분리하여 그 부피의 2.5배의 100% ethanol로 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하였다. 세척한 RNA는 건조시킨 후 DEPC를 처리한 멸균수에 녹여 사용하였다.

#### 4. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)과 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

cDNA를 합성하기 위한 역전사 반응은 50 mM Tris-HCl (pH8.5), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 각 1 mM dNTP, 0.5 units의 RNase inhibitor, 2.5 μM oligo dT<sub>15</sub>, 0.25 units의 reverse transcriptase, AMV (Boehringer Mannheim)를 혼합하여 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer)에서 65℃, 10분; 42℃, 60분; 99℃, 5분간 수행하였다. 합성된 cDNA는 PCR을 수행하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

중합효소 연쇄반응에 사용한 primers는 sY129,

**Table 2.** The rate of Y chromosome microdeletion in azoospermic men and oligospermic men

Indication	deletion rates	
Azoospermia	non-obstructive	3/32 (12.5%)
	severe	1/9 (11.1%)
Oligozoospermia	moderate	0/2
	Total	5/43 (11.6%)

sY134, sY147, sY148, sY152, sY156, sY254, sY255, sY277, sY283, sY269, DAZ, DAZH이며 반응은 최종 20 μl에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 각 0.2 mM dNTP, 20 pmol의 primer 쌍, 0.5 units의 Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany), 그리고 50-100 ng의 환자 genomic DNA를 혼합하여 수행하였으며 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Stratagene)에서 처음 94℃에서 2분간 반응한 후 94℃, 40초; 58℃, 60초, 또는 62℃, 1분; 72℃, 1분의 cycle을 35회 수행한 후 최종적으로 72℃에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 증폭산물은 2% agarose gel 전기영동법으로 분석하였으며 결과가 음성으로 나온 환자에 대해서는 PCR error를 배제하기 위하여 3번 이상의 독립적인 실험을 통하여 최종적으로 결과를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 무정자증 환자와 희소정자증 환자에서 Y 염색체 미세결실의 확인

각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 양성대조군으로부터는 각 증폭산물을 관찰할 수 있었으며 음성대조군으로부터는 어떠한 증폭산물도 관찰할 수 없었다. 32명의 무정자증 환자와 11명의 희소정자증 환자를 대상으로 한 실험을 분석한 결과, 무정자증 환자 중에서는 4명 (12.5%)이 한 개의 STS 이상에서 Y 염색체의 미세결실을 보였으며, 희소정자증 환자 중에서는 1명 (9%)이 미세결실을 나타내었다 (Table 2). 총 43명의 환자 중 5명 (11.6%)이 Y 염색체 상 미세결실을 나타내었지만 이들 중 2명만이 최근 정자형성과정에 있어서 중요한 역할을 할 것이라 제안된 DAZ 부위에 미세결실이 관찰되었으며

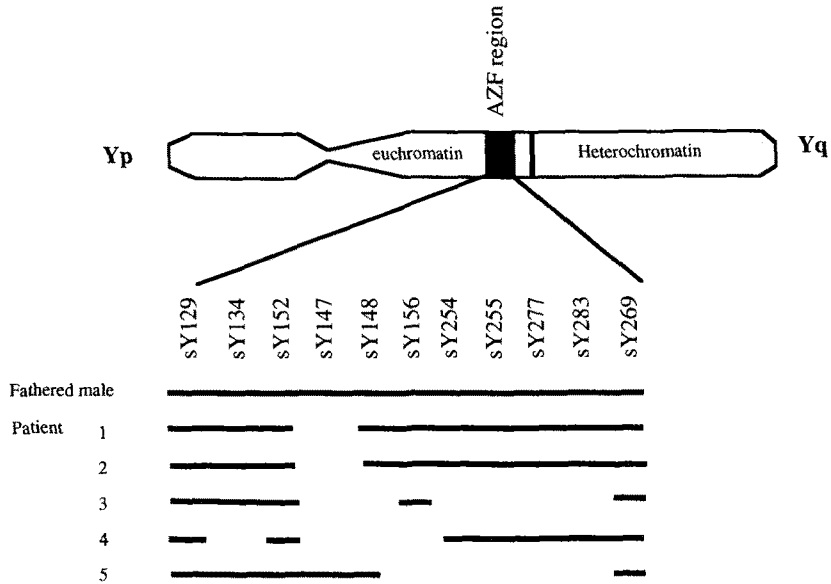


Fig. 1. Deletion mapping the AZF region on human Y chromosome.

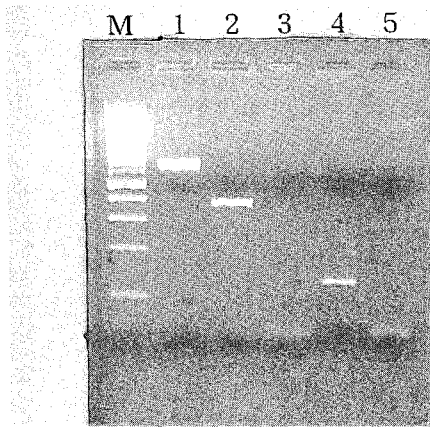


Fig. 2. Pattern of *DAZ* and *DAZH* gene expression in azoospermic men. Detection of *DAZ* mRNA and *DAZH* mRNA in azoospermic men by RT-PCR  
 Lane 1, positive control ( $\beta$ -actin)  
 Lane 2, *DAZ* mRNA, azoospermic patient without deletion of *DAZ* gene  
 Lane 3, *DAZ* mRNA, azoospermic patient with deletion of *DAZ* gene  
 Lane 4, *DAZH* mRNA, azoospermic patient without deletion of *DAZ* gene  
 Lane 5, negative control (no RT)  
 M, molecular weight marker XIV (Boehringer Mannheim)

나머지 3명의 경우는 *DAZ* 부위 이외의 deletion interval 5L-6F에서 미세결실이 관찰되었다 (Figure 1).

## 2. *DAZ*와 *DAZH*의 발현 양상

미세결실이 있는 환자에서 *DAZ* gene의 발현 양상을 관찰하고 또한 미세결실이 관찰되지 않는 환자에서 *DAZ* gene이 제대로 발현되어지는가를 관찰하기 위해서, 환자의 고환 조직으로부터 RNA를 추출하여 역전사-증합효소 연쇄반응을 수행한 결과 genomic DNA에서 *DAZ* gene의 미세결실이 관찰된 환자에서는 예상대로 *DAZ* mRNA의 증폭산물이 관찰되지 않았으며 미세결실이 없는 1명의 환자에서는 *DAZ* mRNA의 증폭산물을 관찰할 수 없었다 (Figure 2).

## 3. Y 염색체 미세결실이 관찰된 환자의 임상적 특징

본 실험 결과, Y 염색체 장완에서 미세결실이 관찰된 한국 남성 불임환자의 평균 나이는 31.4세였고, 고환의 용적은 평균 13.8/13.8 (좌/우) cc로 나타나 결실이 없는 다른 환자군과 별다른 차이는 보이지 않았다. LH의 평균 농도는 3.63 mIU/ml로서 정상치를 나타내었고, 평균 FSH 농도의 경우에도 8.85 mIU/ml로 정상치로 판명되었으며, Testosterone의 평균 농도는 4.0 ng/ml로 정상치를 벗어나지 않은 것으로 나타났다 (Table 3). 이들 LH, FSH, Testosterone의 평균 농도는 결실을 나타내지 않은 다른 환자군의 평균 농도와 특별

**Table 3.** Clinical characteristics of 5 infertile men with microdeletions of Y chromosome

Patient number	Indication	Age	Testes size (cc)	Histology	Karyotype	LH	FSH	T
1	OATS	29	12/12	severe hypospermatogenesis	46 XY	1.5	4.3	4.6
2	Azoospermia	28	16/16	maturation arrest	46 XY	2.6	6.2	2.3
3	Azoospermia	30	12/12	severe hypoplasia	46 XY	4.8	16	5.2
4	Azoospermia	35	14/14	Sertoli cell only	46 XY	ND	ND	ND
5	Azoospermia	35	15/15	severe hypoplasia	46 XY	5.6	8.9	3.9

ND, not determined; OATS, oligoasthenoteratozoospermia; LH (mIU/ml), leuteinizing hormone; FSH (mIU/ml), follicular stimulating hormone; T (ng/ml), testosterone.

한 차이를 나타내지 않았다. 또한 세포유전학적인 핵형분석 결과 결실이 관찰된 5명 모두 정상적인 46 XY인 것으로 확인되었으며, 고환의 조직 검사 결과 Sertoli cell only syndrome 1명, maturation arrest 1명, severe hypoplasia 2명, severe hypospermatogenesis 1명으로 나타나 매우 다양한 조직병리학적 소견을 나타내었고 모두 심한 정자형성장애를 나타낸 것으로 관찰되었다.

## 고 찰

사람의 정자형성과정을 조절하는 인자가 Y 염색체상에 존재한다는 것과 남성불임과 그 인자와의 관계는 Tiepolo와 Zuffardi (1976)에 의해서 무정자증을 나타내는 환자의 Y 염색체 장완에서 미세결실을 관찰하여 Y 염색체 장완에 정자형성에 관여하는 *Azoospermia Factor (AZF)*의 존재를 제안하면서부터 시작되었다. 그 이후 AZF를 밝혀내고자하는 여러 연구가 진행되는 가운데 Ma 등 (1993)이 interval 6에 존재하는 유전자를 찾아내면서 분자유전학적인 연구가 더욱 활발히 진행되었다. 이 유전자는 *YRRM1*과 *YRRM2*로서 RNA recognition motif 를 가지고 있고 초기 정자형성과정에 있어서 RNA processing이나 translation 조절 기능을 할 것이라 추측되었다. 그러나 *YRRM1*과 *YRRM2*에 대한 AZF로서의 의문을 제기하는 여러 증거들이 보고되고 있는 가운데 Reijo 등 (1995)은 새로운 유전자인 *DAZ*를 보고 하면서 Ma 등이 보고한 *YRRM1*과 *YRRM2*와 정자형성과는 무관하다는 것을 증명하였으며 *DAZ*가 정자형성을 조절하는 AZF라고 강력히 주장하였다. 이 *DAZ* 유전자는 RNA binding motif 를 갖는 단

백질로서 고환에서만 특이적으로 발현되는 단백질임을 밝혀내었다. 그 후 초파리에서도 *DAZ*와 상동성을 갖는 유전자, *boule*을 찾아내었으며 (Eberhart *et al.*, 1996), 이 *boule* 유전자도 역시 RNA binding domain을 가지고 있고 정소에서만 발현되며 meiotic G2/M transition을 방해하는 것으로 밝혀졌다. 또한 생쥐에서도 정자형성과정과 관련이 있는 유전자인 *Dazla* (*Daz like*, autosomal, Cooke *et al.*, 1996)와 *Dazh* (*DAZ homolog*, Reijo *et al.*, 1996)를 찾아내었고 이 유전자 또한 RNA binding motif를 가지고 있으며 고환에서만 발현이 되는 것으로 관찰되었다. 이들 유전자들은 사람의 *DAZ*와는 달리 상염색체가 아닌 상염색체에 위치하고 있어 정자형성과정에 있어서 상염색체의 RNA binding 단백질에 대한 역할의 가능성을 제시했다. 이렇게 상염색체에서 정자형성과 관련된 유전자가 밝혀지고 있는 가운데 사람에서도 *DAZH* (Saxena *et al.*, 1996)가 상염색체 3번에 위치하고 있다는 것을 찾아냈다.

이와같이 무정자증 또는 희소정자증 환자에서 *DAZ* 지역의 미세결실이 일부 보고 되었고 또한 *DAZ* 이외의 지역에서도 미세결실이 관찰되어 이러한 연구결과를 바탕으로 정자형성과정에 관여하는 유전자가 Y염색체상의 여러지역에서 존재한다는 것을 알 수 있었다 (Najmabadi *et al.*, 1996).

본 실험의 연구결과에서도 양성대조군으로부터는 어떠한 미세결실도 관찰할 수 없었으나 무정자증이나 희소정자증 환자에서는 적지않은 비율로 미세결실이 관찰된 것으로 보아 결실이 있는 환자에 있어서의 정자형성장애는 이런 Y 염색체의 미세결실이 원인이었다는 것을 확인할 수 있었다. 32명의 무정자증 환자와 11명의 희소

정자증 환자를 대상으로 한 실험을 분석한 결과, 무정자증 환자 중에서는 4명 (12.5%)이 Y 염색체의 미세결실을 보였으며, 희소정자증 환자 중에서는 1명 (9%)이 미세결실을 나타내어 다른 연구자와 비슷한 연구결과를 나타내었다 (Reijo *et al.*, 1995; Najmabadi *et al.*, 1996). 그러나 총 43명의 환자 중 5명 (11.6%)이 Y 염색체 상 미세결실을 나타내었지만 이들 중 2명만이 최근 정자형성과정에 있어서 중요한 역할을 할 것이라 제안된 DAZ 부위에 미세결실이 관찰되었으며 나머지 3명의 경우는 DAZ 부위 외의 deletion interval 5L-6F에서 미세결실이 관찰되었다. 이러한 결과는 DAZ 부위와 일치하지 않는 부위에서 미세결실이 높은 빈도로 관찰되어짐에 따라 현재까지 알려진 DAZ 외에 더 많은 유전자가 남성 정자형성 과정에 관여할 것이라는 가능성을 갖게 하였으며 이에 대한 연구가 더 많이 진행되어야 할 것이다. 한편 DAZ의 상염색체 homolog인 DAZH에 대한 중합효소 연쇄반응 결과 어떤 실험군에서도 결실이 관찰되지 않아 더 연구해 보아야 할 필요성을 보여주었다.

미세결실이 있는 환자와 결실이 관찰되지 않는 환자에서 DAZ gene의 발현 양상을 관찰하고, 또 미세결실은 없지만 다른 어떤 요인에 의해 DAZ gene의 발현이 영향을 받지 않을까 하는 생각에서 환자의 고환 조직으로부터 RNA를 추출하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 genomic DNA에서 DAZ gene의 미세결실이 관찰된 환자에서는 예상대로 DAZ mRNA의 증폭산물이 관찰되지 않았다. 그러나 DAZ gene에 미세결실이 없는 1명의 환자에서는 DAZ mRNA의 증폭산물이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 genomic DNA 상의 결실외에 다른 요인이 DAZ의 발현에 관여하며 결국 정자형성과 깊은 관련이 있을 것이라 생각되어진다.

또한 미세결실이 관찰된 환자의 고환 용적은 평균 13.8/13.8 (좌/우) cc로 나타나 결실이 없는 다른 환자군과 별다른 차이는 보이지 않았다. LH의 평균 농도는 3.63 mIU/ml, 평균 FSH 농도의 경우 8.85 mIU/ml, 그리고 Testosterone의 평균 농도는 4.0 ng/ml로 측정되어 정상치를 벗어나지 않은 것으로 나타났다. 이들 LH, FSH, Testosterone의 평균 농도는 결실을 나타내지 않은 다른 환자군의 평균 농도와 특별한 차이를 나타내지 않았다. 이 결과를 볼 때 미세결실이 있는 환자

군에서는 이런 호르몬과 정자형성과는 특별한 연관 관계가 없음을 제시해주고 있다. 염색체 이상으로 인하여 오는 불임 (Ataya *et al.*, 1983; Chandley *et al.*, 1986; Micic *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1988) 또한 보고가 되어 있지만 본 실험에서 결실이 관찰된 5명은 핵형분석 결과 모두 정상적인 46 XY인 것으로 확인되어 일반적인 핵형분석 방법으로는 Y 염색체 미세결실을 확인할 수 없을 뿐만 아니라 이 결과를 바로 정자형성 장애의 진단과 관련지을 수 없음을 알 수 있었다. 고환의 조직 검사 결과 Sertoli cell only syndrome, maturation arrest, severe hypoplasia, severe hypospermatogenesis으로 나타나 매우 다양한 조직병리학적 조건을 보여, 호르몬 검사와 핵형분석과 마찬가지로 이러한 검사결과와 분석으로는 정자형성 장애의 진단이 불가능하다는 것을 알 수 있다.

전세계적으로 분자생물학적 기술의 발달로 인하여 생물학과 의학 분야는 빠르게 발전해 나아가고 있으며 여러 질병들을 정복해 가고 있다. 불임 분야 역시 이제 분자유전학 관점에서 문제점들을 보려는 노력이 필요할 때이다. 특히 남성 불임에 있어서 무정자증 또는 희소정자증 환자에서 정자형성 과정에 관여하는 유전자의 발견으로 남성불임을 극복하는데 중요한 요인이 된다고 볼 수 있으며 현재까지 제안된 정자형성에 관여하는 유전자는 Y 염색체상의 DAZ를 비롯한 여러 부위와 상동염색체 3번에 존재하는 DAZH가 관련이 있다고 볼 수 있다. 결론적으로 남성의 정자형성 과정은 여러 유전자에 복합적으로 조절되는 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 더 많이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 실험에서는 한국 남성 불임환자에서 Y 염색체 상의 미세결실 유무를 조사하고 또한 현재까지 정자형성 과정에 필수적이라 제안된 DAZ gene이 고환 조직에서 발현되는 양상을 관찰하기 위하여 무정자증 환자 32명, 희소정자증 환자 11명, 그리고 조직을 얻을 수 있었던 환자 21명에 대하여 STS primer를 이용한 중합효소 연쇄반응 방법과 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 환자들을 분석하였다. Y 염색체의 미세결실 분석을 위해 사용한 primers는 비폐쇄성 무정자증

환자에서 결실 빈도가 높게 관찰되어온 sY129, sY134, sY147, sY148, sY152, sY156, sY254, sY255, sY277, sY283, sY269을 사용하였다. 고환 조직에서의 *DAZ*와 *DAZH*의 발현 양상을 관찰하기 위하여 각각의 유전자에 특이적인 primer를 이용하였다. 각 환자들로부터 채취한 말초혈액에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 무정자증 환자 32명 중에서는 4명 (12.5%)이 한 개의 STS 이상에서 Y 염색체의 미세결실을 보였으며, 희소정자증 환자 11명 중에서는 1명 (9%)이 미세결실을 나타내었다. 총 43명의 환자 중 5명 (11.6%)이 Y염색체 상 미세결실을 나타내었지만 이들 중 2명만이 최근 정자형성과정에 있어서 중요한 역할을 할 것이라 제안된 *DAZ* 부위에 미세결실이 관찰되었으며 나머지 3명의 경우는 *DAZ* 부위 외의 deletion interval 5L-6F에서 미세결실이 관찰되었다. 또한 환자의 고환 조직으로부터 RNA를 추출하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 genomic DNA에서 *DAZ* gene의 미세결실이 관찰된 환자에서는 예상대로 *DAZ* mRNA의 증폭산물이 관찰되지 않았으며, 미세결실이 없는 환자 1명에서도 *DAZ* mRNA의 증폭산물을 관찰할 수 없었다.

이상의 결과로 미루어보아 Y 염색체 상의 미세결실은 정자형성과정에 적지 않은 영향을 미치고 있음을 알 수 있고 그 위치는 Y 염색체 장완 전반에 걸쳐 있으며 특히 deletion interval 6에 존재하는 유전자가 정자형성과정에서 중요한 역할을 할 것이라는 제안을 더욱 뒷받침해줄 것이다. 그러나 *DAZ* 부위와 일치하지 않는 부위에서의 미세결실이 높은 빈도로 관찰되어짐에 따라 현재까지 알려진 *DAZ* 외에 더 많은 유전자가 남성 정자형성과정에 관여할 것이라는 생각을 갖게 하며 이에대한 연구가 더 많이 진행되어야 할 것이다.

## 인 용 문 헌

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.

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.

Clermont Y: Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat* 1966, 118, 509-524.

Dym M: Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natn Acad Sci USA* 1994, 91, 11287-11289.

Foote S, Vollrath D, Hilton A, Page DC: The Human Y Chromosome: Overlapping DNA Clones Spanning the Euchromatic Region. *Science* 1992, 258, 60-66.

Henegariu O, Hirschmann P, Kilian K, Kirsch S, Lengauer C, Maiwald R, Mielke K, Vogt P: Rapi-screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia* 1994, 26, 97-106.

Hull MGR: Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Brit med J* 1985, 291, 1693-1697.

Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita I, Namiki M, Iwamoto T, Tamura S, Minowada S, Nakahori Y, Nakagome Y: PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patient: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994, 3, 1965-1967.

Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargreave TB, McBeath S, Chandley AC: Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in Azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992, 1, 29-33.

Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, Wolfe J, Cooke HJ, Hargreave 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.



- Mimic M, Mimic S, Babic M, Diklic V: Phenotype of two males with abnormal Y chromosomes. *Clin Genet* 1990, 37, 321.
- Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, de Kretser DM, Baker HWG, McLachlan RI, Loveland K A, 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.
- 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 S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics* 1995, 10, 383-393.
- Sandberg A: The Y chromosome Part B: Clinical aspects of Y chromosome abnormalities. In series: Progress and Topics in Cytogenetics, Alan R. Liss, New York.
- Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skalesky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Distèche CM, Page DC: The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genetics* 1996, 14, 292-299.
- Silber SJ: The relationship of abnormal semen parameters to male fertility. *Hum Reprod* 1989, 4, 947-953.
- Tiepolo L and Zuffardi O: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976, 34, 119-124.
- Vergnaud E, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J: A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridisation. *Am J Hum Genet* 1986 39, 104-124.
- 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, Torres de Caballero OM, Giraldo A: Yq deletion, aspermia, and short stature. *Hum Genet* 1977, 39, 117-122.