

Mitochondrial DNA in Human Gametes and Embryos

포천중문의대 여성의학연구소

이 속 환

I. mtDNA in General

1. 에너지대사

미토콘드리아는 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 작용으로 ATP를 생성하는 모든 진핵 세포 (eukaryotic cell)에서 필수불가결한 organelle로써 핵유전자 (nuclear gene) 이외에 미토콘드리아내에 16,569 bp 크기를 가진 mtDNA를 여러 copy 함유하고 있다.

1981년 염기서열이 밝혀진 원형의 인간 mtDNA는 미토콘드리아의 4분획인 outermembrane, intermembrane space, innermembrane, matrix 중에서 matrix내에 존재하는데 13개의 respiratory chain 구성단백질과 22종의 tRNA, 2종의 rRNA를 encode한다 (Table 1).

Table 1.

tRNA (22)	H loop (14)	L loop (8)
rRNA (2)	12S rRNA	16S rRNA
I (NADH dehydrogenase)	18-40	7 (ND1,2,3,4,4L,5,6)
II (Succinate-CoQ-reductase)	4	0
III (CoQ-Cyto.c reductase)	11	1 (Cyto B)
IV (Cyto. c oxidase)	13	3 (CoI,II,III)
V (ATPsynthase)	14	2 (ATPase6,8)

2. mtDNA와 복제 (Replication)

이와 같이 미토콘드리아는 산화적 인산화 과정을 거쳐 ATP를 생성하여 세포의 주된 에너지 공급을 하게 되는데 한 개의 세포는 에너지 요구량에 따라 수백개에서 수천개의 미토콘드리아를 가지고 있으며 한 개의 미토콘드리아는 2~10개의 mtDNA를 갖고 있다.

mtDNA는 핵유전자의 복제와 무관하게, 즉 세포주기 (cell cycle) 당 한번만 복제되는 핵유전자와는 달리 여러번 복제할 수도 있어서 세포가 얼마나 역동적 (dynamic) 인가에 따라 미토콘드리아 수가 변화하는 것처럼 미토콘드리아당 mtDNA copy수도 변화할 수 있다.

mtDNA의 복제에 관여하는 모든 인자들은 전부 핵유전자에 의해 code되며 mtDNA복제에 관여

하는 몇가지 transcriptional activator 중 mtTFA 또는 *Tfam* (mitochondrial transcription factor A)는 유일하게 포유류의 미토콘드리아에서 규명된 인자으로써 mtDNA copy수를 조절하는 일을 하게 되어 미토콘드리아의 생합성 (biogenesis)과 수정란 발달 (embryonic development)에도 중요한 역할을 한다.

3. Heteroplasmy

mtDNA에는 보호막의 역할을 할 수 있는 히스톤 (histone)이 없고 DNA 복구기전 (DNA repair mechanism)이 잘 되어있지 않기 때문에 핵유전자에 비해 돌연변이 (mutation)율이 10~20배나 높아서 돌연변이가 생기면 결국 에너지 대사이상이 초래된다.

또 한가지 mtDNA 특징은 세포와 조직에 따라 처음 난자로부터 시작된 mtDNA가 수십억개의 체세포로 증식되고 segregate되는 과정에서 조직 및 세포마다 다른 mtDNA를 가질 수 있으며 부모에게서 반반씩 유전되지 않고 세포질이 풍부한 난자에 있던, 즉 모계의 것이 자손에게 넘어간다 (Maternal inheritance). 그리고 각 세포에는 많은 수의 mtDNA를 갖고 있는데 정상적인 것과 돌연변이를 일으킨 세포가 섞인 heteroplasmy가 나타날 수 있다.

II. mtDNA in Sperm Function

1. Uniparental Inheritance

mtDNA의 유전되는 양상은 전술한 바와 같이 모계로부터 유전되는데 그 이유로는 포유류에서는 부계의 미토콘드리아가 난자로 진입한 뒤 수정되고 나면 일정시간이 지난 뒤 몇가지 기전에 의해서 소실되기 때문이다. 또 다른 가설은 난자와 정자간의 큰 mtDNA copy수 차이에 의한 것으로 설명되는데 즉 난자 한개에는 10^5 의 mtDNA copy를 갖는 반면 정자에는 50~75개의 mtDNA copy수만 있기 때문이다.

2. 정자에서의 mtDNA 재배열 (mtDNA rearrangements in spermatozoa)

정자세포에서는 돌연변이를 일으키는 mtDNA 재배열의 빈도가 낮는데 그 이유로는 우선 성숙 정자까지 도달하는데 걸리는 life span이 짧은 데다가 돌연변이를 가진 미토콘드리아에 대한 natural selection이 잘 일어나기 때문이다. 그러나 이 학설에는 반대의견도 있는데 실제적으로 정자에서도 mtDNA의 돌연변이가 높은 빈도로 있지만 수정된 뒤에는 정자 mtDNA는 소실되기 때문에 유전이 되지 않을 따름이라는 의견이다.

어쨌든 somatic mtDNA와 마찬가지로 정자도 돌연변이에 쉽게 노출이 되어 정상 정자기능을 가진 사람에서도 분화가 일어나는 동안에 유지가 안되어 상당량의 mtDNA 돌연변이를 가질 수 있고 이것이 높은 빈도의 염색체이상과도 무관하지 않다.

3. 정자 mtDNA의 소실

전술한 바와 같이 난자로 진입한 정자 mtDNA는 수정되고 나서 2-4-8 세포주기 때 소실이 되는데 소실되는 기전이 현재 확실하게 밝혀지지는 않았지만 수정 후 미토콘드리아가 파괴 (destruction) 되기 때문이다. 이런 파괴는 intraspecies mating에서만 나타나고 interspecific hybrid에서는 정자 mtDNA를 인지하지 못하여 그대로 정자 mtDNA는 존재하게 된다. 즉 정자 mtDNA의 소실은

species-specificity를 나타낸다.

또 다른 설은 host cell에서 정자 mtDNA의 복제장애로 인해 mtDNA copy수가 줄어들면서 소실된다는 의견도 있다. 어쨌든 이와 같은 정자 mtDNA의 소실은 mtDNA의 모계유전을 이론적으로 더욱 뒷받침한다 (Maternal Inheritance).

III. mtDNA in Oocyte and Embryo

1. mtDNA in Oogenesis and Embryogenesis

체세포에 있는 미토콘드리아 copy수는 $10^3 \sim 10^4$ 개로 알려져 있는 반면 한 개의 성숙난자 (mature oocyte)에는 10^5 의 copy수가 존재하는 것으로 보아 배형성 (embryogenesis)에는 대량의 에너지가 필요함을 알 수 있다. 이와 같이 난자가 성숙하기 위해서는 미토콘드리아가 축적되어야 하는데 oogenesis 동안에 100배가 증가하지만 미토콘드리아당 mtDNA copy수는 오히려 감소한다는 보고도 있다. Oocyte 한 개에 있는 10^5 개의 copy수는 blastocyst 까지는 복제과정이 일어나지 않고 Meiosis II의 개시 (resumption), 수정 및 발달을 위해서는 미토콘드리아가 대량의 에너지를 만들어 내고 저장해야 한다.

난자가 30~40년 동안 생식기능을 보존하기 위해서는 미토콘드리아의 역할도 필요하고 이런 미토콘드리아의 축적이 난자발육, 수정, 더 나아가서는 embryo development에 중요한 역할을 한다. 그래서 착상전 시기에 수정실패나 embryo 발달에 실패하는 경우를 보면 mtDNA가 충분치 않고 때로는 세포질의 병적 현상 및 염색체이상도 동반될 수 있다.

2. Bottleneck and skewed expression

Oogenesis 초기에는 극히 적은 양의 mtDNA만 존재하지만 cytokinesis 동안 mtDNA copy수가 random하게 segregate되고 나서 oogenesis 후기 때쯤이면 그 숫자는 10^5 으로 증폭이 되어 (Bottleneck theory) 난자성숙 등에 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아는 모계유전을 하므로 oogenesis, 수정 및 embryo 발달과정에 혹시 mtDNA 돌연변이가 있는 경우 돌연변이를 갖고 있는 mtDNA가 다음 세대로 유전되는 것을 방지하기 위해서는 돌연변이를 일으킨 mtDNA가 filter out 되어야 하는데 바로 이 과정 중에 oogenesis 동안 stringent Bottleneck 기전이 적용이 된다. 즉 oogenesis 때 Bottleneck 기전으로 mtDNA 숫자가 적어지면서 돌연변이를 일으킨 mtDNA도 걸러지게 된다. 그래서 embryo나 blastocyst에 있는 돌연변이 mtDNA양은 oocyte와 비교할 때 훨씬 적다. 그리고 이런 돌연변이 mtDNA가 제거되는데는 "selection mechanism"이라는 용어도 적용이 된다.

Bottleneck의 시점과 기전은 돌연변이의 유무보다는 단일세포에서 mtDNA 돌연변이를 정량해야 정확하데 현실적으로 단일세포에서 정량화는 그 기법이 아직 개발되지 않고 있는 실정이다. 사실 Bottleneck의 시점은 embryogenesis 초기라는 주장도 있었으나 난자에서 mtDNA 일부가 선택적으로 증폭되어 wild-type과 mutant-type이 섞일 수 있는, Skewed expression 현상도 있는 것을 보면 embryogenesis 때보다는 early oogenesis 즉 primary oocyte가 분화되기 전으로 알려지고 있다.

3. 노화난소와 mtDNA

나이가 많을수록 난소기능이 떨어져서 임신율이 낮아진다는 것은 놀라운 사실이 아니며 이 과

정에는 mtDNA가 관련되어 산화적 인산화 (OXPHOS)의 변화, cytoskeleton, 수정과 embryo 발달에 대한 세포의 항산화체계 (antioxidant system)의 변화 때문으로 설명한다. 즉 이런 변화가 ATP 양의 감소에 영향을 미칠 수 있어 poor quality의 난자와 수정란이 고령여성에서 많은 하나의 원인이 된다.

그밖에 고령여성의 수정이 안된 난자에서 보면 젊은 사람보다 mtDNA 결손 등의 돌연변이가 많다는 연구보고도 있다.

IV. Mitochondrial Gene Expression

1. Unfertilized oocytes and embryos

수정이 안된 난자와 수정란에서의 ATPase6 gene 발현을 비교하기 위해 RT-PCR을 한 결과 수정이 안된 난자에서 수정란보다 발현이 많이 떨어지는데 이것은 수정까지 가는데 필요한 산화적 인산화 감소와 이에 따른 ATP 생성의 장애로 풀이할 수 있다.

2. ICSI- and Non-ICSI Amniocytes

보조생식기법 (ART, Assisted Reproductive Technology) 중 가장 혁신적인 방법의 하나로 1992년 처음 임신에 성공한 정자직접주입술 (Intracytoplasmic Sperm Injection)은 현재까지는 안전한 기법으로 인정되고 있다. ICSI를 거쳐서 임신이 된 경우와 정상임신에서의 염색체이상의 빈도는 ICSI 군이 정상보다 약간 높다는 보고가 있는데 mtDNA의 발현여부를 비교해본 바에 의하면 Complex V에 해당하는 ATPase6 gene의 발현에는 차이가 없는 것으로 보아 적어도 ATPase6 gene에는 정자 직접주입술이 안전할 수 있다는 실험이다.

3. mtDNA in OT (Ooplasmic Transfer)

IVF 시술 중 반복해서 착상에 실패하는 환자에서 시행되는 ooplasmic transfer는 시술 후 돌연변이를 일으킨 mtDNA의 점점, ooplasmic transfer (OT)가 mitochondrial inheritance와 미토콘드리아 기능에 미칠 수 있는 영향에 대한 연구가 관건이 된다.

사실 OT에 대한 평가는 초기에는 부정적인 면, 즉 OT 후 임신이 되어 임신중기 때 mtDNA fingerprinting 등으로 mtDNA를 분석해 보았을 때 공여자 (donor)의 것이 아닌 산모의 mtDNA만 검출이 되어 시술의 이점에 대한 의문이 대두되었었다. 이 문제에 대한 시술자 (Dr. Cohen group)의 의견은 아마도 수여자 (recipient) 한테 주입된 공여자 ooplasm의 양이 17% 정도였기 때문에 공여자 mtDNA가 있었다고 해도 아주 소량의 mtDNA는 염기서열 (sequencing)이나 ethidium bromide staining으로 검출되지 않을 수 있다는 주장과 함께 어쨌던 공여자의 것이 검출되지 않으므로 mtDNA 질환이 있더라도 transfer되지 않는다는 보고를 했었다.

그러나 최근에는 OT 후 우선 mtDNA 돌연변이를 보면 "Bottleneck" 기전으로 제거되는 natural selection의 이점을 가지고 있고 시술초기보다 시술기법 등의 개발로 착상 전 수정란 (preimplantation embryo), 임신중기 양수세포 (amniocytes), 태반, 그리고 분만 후 cord blood에서 공여자와 수여자 mtDNA를 검출할 수 있었다. 앞으로의 과제는 제공받은 mtDNA inheritance의 변화, 그리고 OT를 시술받고 태어난 아기에서 heteroplasmic DNA 분포가 어떻게 되는지에 대한 연구가 진행

되어 OT후 mtDNA가 확실하게 난자와 수정란의 발달능력을 개선시킨다는 입증되어야 한다.

4. 전자간증 (Preeclamptic Pregnancy)

전자간증의 병리기전은 규명이 되지 않았지만 태반기능장애가 가장 근접한 하나의 가설로 알려졌기 때문에 태반에서의 미토콘드리아 유전자 발현을 보기 위해 Cytochrome c Oxidase III와 ATPase6 및 H-and L-strand 돌연변이 여부를 보기 위해 promotor region을 검색한 결과 Cytochrome c Oxidase III와 ATPase6 발현은 정상인에서 보다 전자간증 환자에서 현저히 감소했으며 H-strand promotor region에서 3개의 T insertion (553, 557, 560)과 C-T substitution (567) 및 정상 AGA와 돌연변이 AAA의 combination을 보여, mitochondria Complex IV, V와 H-strand promotor region mutation이 전자간증의 발생기전의 하나가 될 수 있음을 시사한다.

5. 염색체 비분리 (Chromosomal Non-disjunction)

염색체 비분리 현상과 미토콘드리아 유전자기능과의 관계를 알기 위해 Chromosomal non-disjunction의 대표적인 질환인 Down syndrome에서 ATPase6 gene과 Tfam (mitochondrial transcription factor A)의 발현을 비교했다. 염색체가 분리되어 spindle assembly 되기까지는 대량의 에너지가 요구되는 ATP dependent 과정이므로 ATPase6 gene 발현을 보았고 Tfam은 mtDNA의 전사 (transcription) 및 복사 (replication)에 중요한 regulator로 작용하기 때문이다.

Down syndrome에서 정상임신보다 ATPase6 gene과 Tfam 발현이 감소된 것으로 보아 Down syndrome 같은 염색체 비분리 현상이 mitochondria dysfunction과 연관이 있을 수 있다는 연구이다.

V. Mutation in mtDNA

1. Common deletion (Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷) in Oocytes and Embryos

지금까지 규명된 난자와 수정란에서의 mtDNA 돌연변이 중 가장 많이 알려진 것이 "common deletion"으로 mtDNA 8470-13447에 해당하는 4977 bp의 결손 (deletion)을 의미한다. 이 common deletion은 난자와 같은 non-dividing cell에서는 빈도가 높는데 그 이유는 DNA mutagen에 아무래도 오래 노출이 되기 때문이다. 난자와 수정란에서의 빈도를 보면 난자에서 빈도가 더 높아서 수정되고 나면 오히려 빈도가 낮아지는데 bottleneck 기전에 의해서 결손이라는 돌연변이가 걸러지는 것으로 이해된다. 그밖에 다른 기전은 확실치 않으나 nuclear mechanism으로 수정란에서는 결손의 빈도가 낮을 수 있다는 보고가 있다.

그러나 수정란에서의 결손이 앞으로 blastocysts, 임신 중 양수세포, 그리고 태아조직 (fetal tissue) 및 그 다음 세대의 자손 (offspring)에서 어떤 영향을 미칠 수 있을지는 결손에 대한 정확한 copy 수의 정량분석을 해서 추적관찰을 해야 한다.

2. Δ mtDNA with tissue-specific and age-related variation

결손 등의 mtDNA 돌연변이의 축적이 조직과 연령에 따라 연관성이 있다는 가설에는 논란이 많다. 그리고 이 돌연변이가 phenotypic expression of ageing, common degenerative disease로 발전할는지 아니면 임상적으로 큰 의미가 없는 것인지에 대한 여부도 논란이 있다.

본 실험은 lymphocyte, ovary, uterine muscle, abdominal muscle에서의 결손의 빈도를 보면 ovary에서 가장 높았고 lymphocytes에서는 제일 낮은 빈도를 보였다. 그리고 연령별로 보면 역시 젊은 나이보다 고령에서 높은 빈도를 보였다. Lymphocytes에서 낮은 빈도의 이유는 selective pressure에 의해 rapidly dividing cell에서 defect가 lost되는 원리로 설명할 수 있으며 나이를 먹음에 따라 결손이 ovary←abdominal muscle←uterine muscle 순으로 축적됨을 볼 수 있었으나 결손을 포함한 mtDNA 돌연변이와 biochemical or clinical defect에 관한 연구는 보다 많은 tissue 분석 및 정량화가 필요하다.

3. Quantification of mtDNA in GDM (Gestational Diabetes Mellitus) and mitochondrial tRNA mutation (A3243G)

임신성 당뇨병 (GDM, gestational diabetes mellitus)에도 mtDNA가 관련이 있는데 이것은 미토콘드리아 질환에서 당뇨병이 흔히 발견되기 때문이다.

본 실험에서는 GDM에서 tRNA 돌연변이를 알아보고 또 mtDNA의 양적인 변화를 알기 위해 ATPase6 유전자에 해당하는 부위를 internal control로 하여 competitive PCR을 시행했다. 결과는 1 레에서 tRNA^{Leu}의 A3243G 돌연변이가 있었고 mtDNA copy수는 정상 control 군과 차이가 없었다. 그러나 정확한 결론을 얻기 위해서는 더 많은 표본수에 대한 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. 김숙경, 신찬수, 박경수, 김성연, 조보연, 이홍규, 고창순. 한국인 인슐린 비의존형 당뇨병 환자에서 미토콘드리아 DNA의 점 돌연변이에 대한연구. 당뇨병 1997; 21: 147-55.
2. Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, Matt DW. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. Mol Hum Reprod 1999; 5(10): 927-33.
3. Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, Matt DW. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. Mol Hum Reprod 1999; 5: 927-33.
4. Bavister BD, Squirrell JM. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. Hum Reprod 2000; suppl 2: 189-98.
5. Beerman F, Hansmann I. Follicular maturation, luteinization and first meiotic division in oocytes after inhibiting mitochondrial function in mice with chloramphenicol. Mut Res 1886; 160: 47-54.
6. Blok RB, Gook DA, Thorburn DR, Dahl HH. Skewed segregation of the mtDNA nt8993 (T→G) mutation in human oocytes. Am J Hum Genet 1887;6:1495-501.
7. Brenner C, Wolny Y, Barritt J, Matt D, Munne S, Cohen J. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos. Mol Hum Reprod 1998; 4: 887-92.
8. Briggs DA, Power NJ, Lamb V, Rutherford AJ, Gosden RG. Amplification of DNA sequences in polar bodies from human oocytes for diagnosis of mitochondrial disease. The Lancet 2000; 355: 1520-21.
9. Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlok J, Jagiello G, Schon E. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. Am J Hum genet 1995; 57: 239-47.
10. Chen Y, Liao WX, Roy AC, Loganth A, Ng SC. Mitochondrial gene mutations in GDM. Diabet Resear

- and Clin Prac 2000; 48: 29-35.
11. Dahl HH, Thorburn DR, White SL. Towards reliable prenatal diagnosis of mtDNA point mutations: studies of nt8993 mutations in oocytes, fetal tissues, children and adults. Hum Reprod 2000; suppl2: 246-55.
 12. Furui T, Kurauchi O, Tanaka M, Mizutani S, Ozawa T, Tomosa Y. decrease in Cytochrome c Oxidase and Cytochrome Oxidase Subunit I messenger RNA levels in preeclamptic pregnancies. Obstet Gynecol 1994; 84: 283-8.
 13. Giovanni M, Domonic T, Lefkothea C, Francesco P, Schon E. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. Am J Hum Genet 1997; 61: 953-60.
 14. Inagaki H, Kitamo S, Lin KH, Maeda S, Saito T. Inhibition of mitochondrial gene expression by antisense RNA of mtTFA. Biochem Mol Biol Int 1998; 3: 567-73.
 15. John M, Shoffner Wallace DC. Mitochondrial genetics: principles and practice. Am J Hum Genet 1992; 51: 1179-86.
 16. Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive ageing in women. Fertil Steril 1995; 3: 577-83.
 17. Kitagawa T, Suganuma N, Nawa A, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa, et al. Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribinucleic acid in postmenopausal ovaries. Biol of Reprod 1993; 49: 730-6.
 18. Lee SH, Han JH, Cho SW, Cha KE, Park SE, Cha KY. Mitochondrial ATPase6 gene expression in unfertilized oocytes and cleavage-stage embryos. Fertil Steril 2000; 73: 1001-5.
 19. Nagley P, Wei YH. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. TIG 1998; 14: 513-7.
 20. Poulton J, Brown MS, Cooper A, Marchington DR, Phillips DI. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life. Diabetologia 1998 ;41: 54-8.
 21. Sathananthan AH, Trouson AO. Mitochondrial morphology during preimplantation human embryogenesis. Hum Reprod 2000; suppl 2: 148-59.
 22. Taylor KD, Piko L. Mitochondrial biogenesis in early mouse embryos: expression of the mRNAs for subunit IV, Vb, and VIIc of the cytochrome c oxidase and subunit 9 of H(+)-ATP synthase. Mol Reprod Devel 1995; 40: 29-35.
 23. Tengan CH, Gabbai AA, Shanske S, Zeviani M, Moraes C. Oxidative phosphorylation dysfunction does not increase the rate of accumulation of age-related mtDNA deletion in skeletal muscle. Mut Res 1997; 379: 1-11.
 24. Tomas C, Orava M, Tuomivaara L, Martiikanien H. Low pregnancy rate is achieved in patients treated with intracytoplasmic sperm injection due to previous low or failed fertilization in in-vitro fertilization. Hum Reprod 1998; 13: 65-70.
 25. Van Blerkom J, Davis P, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 1995; 10: 415-54.
 26. Van Blerkom J, Runner MN. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. Am J Anat 1984; 171: 335-55.

27. Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 1998; 13: 2857-68.
 28. Zeviani M, Antozzi C. Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 133-48.
-