

사람 정자에서 정자 특이적 양이온 채널 CatSper의 발현에 관한 연구

Expression of Sperm-specific Cation Channel CatSper in Human Spermatozoa

Kang Woo Cheon¹, Yeong Jin Choi², Hye Kyung Byun¹, Ji Young Hong¹, Hyung Ki Choi², Ju Tae Seo³

From the ¹Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, ³Department of Urology, Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine and ²Department of Urology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: We aimed to elucidate the expression and intracellular localization of sperm-specific cation channel CatSper in human spermatozoa. Moreover, the relationship between the expression of CatSper mRNA and the motility of ejaculated human spermatozoa were investigated.

Materials and Methods: Using cDNAs extracted from the ejaculated sperm of patients (n=39), the expression of CatSper mRNA was observed by RT-PCR. Semi-quantitative analysis of the CatSper mRNA expression was performed by comparing with the expression of GAPDH mRNA. To elucidate the expression and intracellular localization of CatSper protein, double fluorescent immunocytochemistry for CatSper and β -tubulin was performed.

Results: The CatSper mRNA was expressed in all of the sperm samples. Using semi-quantitative analysis for the amount of CatSper mRNA expression, no significant difference was found between the normozoospermia and asthenozoospermia groups (1.5 ± 0.6 vs. 1.4 ± 0.6 , $p=0.623$). Polyclonal antiserum, generated against a recombinant protein of the N-terminal 160 amino acids of human CatSper, was used. In double fluorescent immunocytochemistry, CatSper protein was found to be expressed in the flagellum of the ejaculated human spermatozoa, and localized in the connecting piece, mid-piece and principal piece, with the exception of the end piece of the flagellum. Moreover, the proportion of CatSper-positive sperm was similar in both the normozoospermia and asthenozoospermia groups.

Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first time ejaculated human spermatozoa have been shown to express the mRNA and protein of CatSper. The results of our RT-PCR and immunocytochemistry suggest that CatSper may play a role in the motility of ejaculated human spermatozoa. (Korean J Urol 2004;45:365-372)

Key Words: Spermatozoa; Sperm motility; Catsper protein, human; RT-PCR, Immunocytochemistry

대한비뇨기과학회지
제 45 권 제 4 호 2004

¹성균관대학교 의과대학
삼성제일병원 생식생물학 및
불임연구실, ³비뇨기과,
²연세대학교 의과대학
비뇨기과학교실

천강우¹ · 최영진² · 변혜경¹
홍지영¹ · 최형기² · 서주태³

접수일자 : 2003년 12월 29일
채택일자 : 2004년 3월 6일

교신저자: 서주태
성균관대학교 의과대학
삼성제일병원 비뇨기과
서울시 중구 목정동 1-19
☎ 100-380
TEL: 02-2000-7674
FAX: 02-2000-7787
E-mail: jtandro@samsung.
co.kr

본 연구는 2003년도 제일의료장학재단 연구비 지원으로 수행되었음.

서 론

고환에서 생성된 정자는 부고환으로 이동되어 고환 후 성숙과정을 거치고 직진 운동성을 획득하게 된다.¹ 정자의 운

동성을 조절하는 가장 중요한 인자로는 칼슘 이온과 cyclic nucleotide를 들 수 있으며, 특히 칼슘 이온은 정자의 운동성과 성숙과정 전반, 그리고 수정의 여러 단계에 걸쳐 영향을 미치는 것으로 보고되었다.^{2,4} 칼슘 이온의 작용은 세포 밖의 칼슘 이온이 정자의 세포막에 존재하는 특정한 칼슘 채널을

통해 세포 내로 유입되면서 특정 신호전달체계를 작동시킴으로써 가능해진다. 정자에 존재하는 칼슘 채널은 크게 voltage-gated calcium channel (Ca_v), cyclic nucleotide-gated calcium channel (CNG), 그리고 transient receptor potential channel (TRP) 등으로 분류할 수 있으며, 현재까지 알려진 calcium channel은 대부분 정자의 두부에 존재하면서 침체반응에 관여하는 것들이다.^{5,8}

CatSper는 2001년 Ren 등⁹이 새로이 발견한 양이온 채널로서, 정자의 미부에서만 특이적으로 발현되고, 정자의 운동성에 중요한 역할을 하는 것이 생쥐에서 밝혀졌다. CatSper라는 이름은 Cation channel of Sperm에서 유래한 것으로, 단백질의 1차 구조가 voltage-gated calcium channel의 $\alpha 1$ subunit과 유사한 것으로 밝혀졌다. Ren 등⁹은 CatSper 유전자를 knock-out시킨 생쥐 (CatSper^{-/-})에서 생산된 정자를 통해 CatSper^{-/-}의 정자는 운동성의 결함으로 인해 난자의 투명대를 전혀 뚫지 못하는 불임을 보인다고 보고하였다. 사람의 CatSper 유전자는 11번 염색체에 존재하며, 생쥐의 그것과 아미노산 서열에서 55%의 동일성과 72%의 유사성을 보이며, 고환에만 그 mRNA가 존재하는 것이 알려졌다.

본 연구에서는 사정된 사람의 정자를 대상으로 하여 CatSper의 발현유무를 mRNA와 단백질 수준에서 확인하고자 하였다. 나아가 CatSper의 발현량과 정자의 운동성 사이에 상관관계가 존재할 수 있는지를 알아보고, 정자에서 발현되는 CatSper 단백질의 발현부위에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 정액채취 및 검사

본 실험에서는 3일간의 금욕기간 후 자위를 통해 사정된 정액을 채취하여 사용하였다. 완전히 액화된 정액을 Markler counting chamber (SEFI Medical Instruments, Ltd., Haifa, Israel)에 떨어뜨린 후, Computer Aided Semen Analyzer (CASA, CellSoft, CRYO Resources Ltd., New York, USA)를 이용하여 정자의 농도 ($\times 10^6/ml$), 운동성 (%) 및 직진성을 측정하였다. 각 검사 항목의 정상치는 WHO¹⁰의 기준에 준하였으며, 직진성의 등급은 직진성이 전혀 없는 것을 0으로 하고 가장 높은 등급을 4로 하여 값을 표시하였다. CASA 결과를 기준으로 운동성이 50% 미만인 경우를 무력정자군, 50% 이상인 경우를 정상군으로 분류하였다. 또한 CASA를 이용한 정자 운동성 검사는 죽은 정자까지 모두 포함하여 그 비율을 구하는 것으로 살아있는 정자만을 대상으로 하여 그 운동성을 측정하지 못하는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 살아있는 정자만을 대상으로 하여 그 운동성을 비교하기 위하여 생존능에 대한 운동성의 비 (motility/ iability

ratio; 0-1)를 구하였다.

2. 정자의 형태 검사와 생존능 검사

정자의 형태 검사는 Papanicolaou 염색방법을 이용하여 수행하였다. 정자의 형태적인 비정상은 다음과 같이 분류하였다. 우선 두부 비정상으로는 round, tapering, double, small, large, amorphous, precursor 형태를 검사하고, 미부 비정상으로는 coiled, double 형태를 검사하였다. 한 슬라이드당 각기 다른 세 곳을 선정하여 각각 100개의 정자를 세고 그 평균을 구하였다.

정자의 생존능 검사는 eosin-nigrosin 염색방법을 이용하였다. 현미경하에서 한 슬라이드당 각기 다른 세 곳을 선정하여 각각 100개의 정자를 세고 그 평균을 구하였다. 살아있는 정자의 판별은 두부가 eosin에 의해 붉은 색으로 염색되지 않는 것으로 구분하였다.

3. 사람 정자에서 CatSper mRNA의 발현 조사

1) Total RNA의 추출: 정액을 차가운 phosphate buffered saline (PBS)와 1:1의 비율로 섞어 잘 혼합한 후, 원심분리기를 이용하여 300g에서 10분간 침전시켜 정자를 추출하였다. 준비된 정자시료는 total RNA 추출과 형광 면역세포화학법을 위한 정자 슬라이드 제작에 사용하였다. 정자로부터 total RNA 추출은 Chomczynski와 Sacchi¹¹의 방법을 사용하였다. 각 정자시료로부터 추출한 total RNA 시료는 역전사 반응을 수행하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

2) 역전사 반응 및 증폭효소 연쇄반응: 정자 시료로부터 추출한 각각의 RNA로부터 cDNA를 얻기 위하여 Cheon 등¹²의 방법에 따라 역전사 반응을 수행하였다. 위의 과정을 통해 얻은 cDNA는 PCR을 수행하기 전까지 -20°C 에 보관하였다. 사람 정자에 CatSper mRNA가 존재하는지를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 제작된 primer 쌍 (Table 1)의 특이성을 검증하기 위하여 nested RT-PCR을 수행하였다. 각각의 cDNA는 2343 bp의 CatSper 전체 cDNA를 포함하는 부분을 증폭할 수 있게 제작된 primer 쌍을 이용하여 1차 증폭하였다. 증폭과정은 Cheon 등¹²이 기술한 방법을 사용하였고, 72°C 에서 3분 30초 동안 연장과정을 수행하였다. 총 30회의 증폭과정을 반복하였다.

1차 증폭된 PCR 산물은 증류수로 100배 희석한 후 2차 증폭에 사용하였다. 2차 증폭과정은 CatSper cDNA 염기서열 1번부터 480번까지를 증폭할 수 있는 primer 쌍을 제작하여 사용하였는데, 이후 2차 증폭산물을 이용하여 항체 제작에 필요한 재조합 단백질을 얻을 목적으로 primer의 양 끝에 특정 cloning site를 첨가하여 제작하였다. 100배로 희석한 1차 증폭산물 4 μ l를 위 1차 증폭과정에서 기술한 반

Table 1. Sequences of PCR primers used in this study

Target cDNA	Size of fragment	F/R*	Sequence of oligonucleotide
CatSper	2373bp	F-o	5'-TCTTTTGGCTCCAGAGTTC-3'
		R-o	5'-TCAATTCCTGAAGTCCTCT-3'
CatSper	522bp	F-i	5'-GGGAATTCATATGGATCAAAACTCAGTGCCTGAAAAGGC-3'
		R-i	5'-CCGCTCGAGGGATAAATTCTCACCGAGATATTGGGG-3'
GAPDH	330bp	F	5'-CGGAGTCAAAGGATTTGGTCGTAT-3'
		R	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

* F: forward primer, R: reverse primer, -o: outer, -i: inner, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

응액에 첨가한 후, DNA thermal cycler를 이용하여 PCR을 수행하였다. 2차 PCR 조건은 위에서 기술한 1차 증폭과정과 동일하며, 72°C 연장과정은 1분 동안 수행하였고, 총 증폭과정을 37회 반복하였다. 최종 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동시키고 UV 하에서 522bp의 PCR 산물을 확인하였다. 각 시료로부터 증폭된 CatSper의 RT-PCR 산물들의 양을 반 정량적으로 비교하기 위하여 house keeping gene의 하나인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 RT-PCR을 동일한 시료를 사용하여 수행하고, 그 발현량을 기준으로 하여 CatSper의 발현량을 분석하였다.

3) CatSper mRNA 발현량의 반 정량적 분석: 각각의 시료에서 발현되는 CatSper mRNA양을 비교하기 위하여 다음과 같은 반 정량적인 방법을 사용하였다. 먼저 CatSper RT-PCR 산물을 전기영동하여 UV하에서 나타나는 band의 intensity를 Image analyser (Bio-Profil Image analysis software, Vilber Lourmat, Cedex, France)를 이용하여 측정하고, GAPDH의 RT-PCR 산물 역시 같은 방법을 이용하여 측정하였다. 한 시료에서 얻어진 두 측정값으로 CatSper/ GAPDH의 비율을 구하고 각 시료에서 얻어진 이 상대 값들을 비교하여 발현량을 반 정량적으로 비교하였다.

4. 사람 정자에서 CatSper 단백질의 발현 조사

1) Anti-CatSper rabbit polyclonal antibody의 제작: 사람의 CatSper 단백질에 특이적인 polyclonal antibody를 제작하기 위한 항원으로 아미노산 서열 1번부터 160번까지의 polypeptide를 사용하였다. 이를 위해 이미 위에서 언급한 방법대로 증폭된 522bp의 CatSper cDNA를 제한효소 *NdeI* 과 *XhoI*을 이용하여 양 끝을 절단하고 pET-21a expression vector (Novagen, Madison, USA)에 삽입하여 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질을 전환시켜 과발현을 유도하였다. 재조합 CatSper 단백질의 정제를 위한 column은 NTA- chelating agarose CL-6B (Peptron Inc., 대전, 한국) 1ml을 이용하였다.

100µg의 정제된 항원을 SDS-PAGE를 이용하여 분획하고, Freund's complete adjuvant와 에멀션화하여 9주령 된 New-zealand White 종의 토끼에 2주 간격으로 3회 피하주사 후, 채혈된 혈액에서 혈청을 분리하여 항혈청으로 사용하였다.

2) 형광 면역세포화학법: 정자시료를 슬라이드에 도말하여 건조시킨 후, 차가운 100% 메탄올에서 10분간 고정하였다. 이후 100% 에탄올과 PBS에 10분씩 담가두었다. 슬라이드는 먼저 5% Normal goat serum, 1% Triton- X100을 첨가한 PBS 용액에 담가 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, CatSper 1차 항체를 1:100의 비율로 PBS와 혼합하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝나면 슬라이드를 깨끗한 PBS로 10분씩 2회 세척하였다. 2차 항체로는 anti-rabbit sheep IgG-Cy3 conjugate (c-2306, Sigma Chemical Co, St Louis, USA)를 사용하였다. 2차 항체는 1:300의 비율로 PBS에 희석하여 사용하였다. 2차 항체 반응 동안 정자의 미부를 동시에 염색하기 위하여 미부 전체에 존재하는 β-tubulin 단백질에 특이적인 anti-β-tubulin mouse IgG-FITC conjugate (1:100 희석)를 사용하였다. 2차 항체와 β-tubulin 항체는 섞어서 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 슬라이드를 깨끗한 PBS로 10분씩 2회 세척하였다. 마지막으로 정자의 두부를 염색하기 위하여 핵을 염색하는 DAPI (DAPI II, Vysis Inc. Downers Grove, USA)와 mounting 용액을 섞어서 슬라이드당 30µl 씩 떨어뜨린 후 커버 슬라이드를 덮고 형광현미경에서 관찰하였다. 각각의 형광사진은 digital camera (Jenoptik, Jena Laser optik systeme, Germany)와 image analysis software를 이용하여 분석하였다.

5. 통계 분석

통계 처리 및 분석은 GraphPad Prism, version 3.0 for windows 프로그램을 이용하였으며, 측정값들 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 검증하기 위하여 Student's

t-test와 Chi-square test를 실시하였다. 각 측정값들은 평균±표준편차로 나타냈고, p value가 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 정상군과 무력정자증군 사이의 정액분석 결과

총 39명의 남성으로부터 채취된 시료 중 정상군은 18개, 무력정자증군은 21개였다. 39명의 평균연령은 33.9세였고, 두 군의 CASA와 생존능 검사결과는 Table 2와 같다. 생존능에 대한 운동성의 비를 측정한 결과 정상군은 그 값이

1.1±0.1로 나타났다. 이는 살아있는 정자가 모두 운동성을 가지고 있다는 것을 의미한다. 반면 무력정자증군에서는 그 값이 0.6±0.3으로 나타나 살아있는 정자의 60%만이 운동성을 가진다는 것을 의미하며 두 군 간에 유의한 차이를 나타냈다 (p<0.0001). 또한 직진성을 단계별로 구분해 보면 가장 직진성이 떨어지는 0-1 사이의 비율이 정상군에서는 22.9±12.3%, 무력정자증군에서는 41.5±24.9%로 무력정자증군에서 유의하게 높았으며 (p=0.007), 가장 직진성이 높은 3-4 사이의 비율은 정상군이 8.0±8.0%, 무력정자증군이 0.6±1.7%로 정상군에서 유의하게 높았다 (p=0.0002). 두 군의 정자에 대한 형태적 검사 결과는 Table 3에 나타났다. 형태

Table 2. Results of semen analysis by CASA and viability test

Parameter	Normozoospermia (n=18)	Asthenozoospermia (n=21)	p value
Age (yr)	34.4±4.4	33.6±3.7	NS
Semen volume (ml)	3.5±1.6	3.2±1.7	NS
Semen pH	7.1±0.3	7.3±0.3	NS
Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)	126.5±45.4	89.9±44.1	0.015
Motility (%)	76.6±8.3	30.5±11.9	<0.0001
Viability (%)	72.7±10.2	51.0±14.4	<0.0001
Motility/viability ratio	1.1±0.1	0.6±0.2	<0.0001
Forward progressiveness	2.3±0.3	1.7±0.5	<0.0001
0-1 (%)	22.9±12.3	41.5±24.9	0.007
1-2 (%)	20.4±5.9	20.2±16.3	NS
2-3 (%)	48.8±16.3	37.9±22.5	NS
3-4 (%)	8.0±8.0	0.6±1.7	0.0002

Values are mean±SD. NS: not significant

Table 3. Analysis of sperm morphology in normozoospermia and asthenozoospermia

Parameter (%)	Normozoospermia (n=18)	Asthenozoospermia (n=21)	p value
Morphological normality	70.1±16.8	67.9±14.5	NS
Round head	6.7±9.1	2.9±5.5	NS
Small head	0.1±0.3	0.2±0.5	NS
Large head	0.2±0.4	1.0±1.1	0.012
Amorphous head	7.1±7.1	6.6±5.9	NS
Precursors	4.1±5.5	1.8±2.3	NS
Tapering head	3.1±2.1	4.4±4.8	NS
Double head	0	0	-
Coiled tail	8.4±8.3	15.2±8.7	0.018
Double tail	0	0	-

Values are mean±SD. NS: not significant

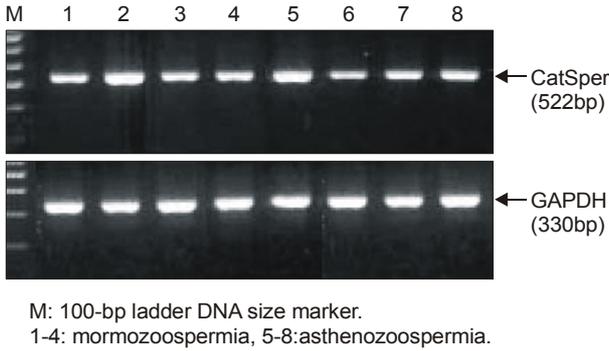


Fig. 1. Nestod RT-PCR analysis for CatSper mRNA expressed in the ejaculated human spermatozoa.

적으로 정상인 정자의 비율은 정상군과 무력정자증군 사이에서 유의한 차이가 없었다 ($p=0.66$).

2. 정자에서 CatSper mRNA의 발현 조사

실험에 사용한 두 군의 정자시료 모두에서 522bp의 Nestod RT-PCR 산물을 확인하였다 (Fig. 1). 정상군의 CatSper mRNA 발현양을 반 정량적으로 분석한 평균값은 1.5 ± 0.6 , 무력정자증군의 평균값은 1.4 ± 0.6 으로, 두 군 사이에서 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 2) ($p=0.623$). 또한 실제 살아있는 정자만을 대상으로 운동성을 산출하였을 경우에도 정상군 ($M/V \text{ ratio} \geq 0.5$)과 무력정자증군 ($M/V \text{ ratio} < 0.5$)의 CatSper mRNA 발현량은 각각 1.5 ± 0.6 및 1.2 ± 0.6 으로 두 군 간에 유의한 차이가 없었다 ($p=0.14$).

3. 정자에서 발현되는 CatSper 단백질의 면역세포화학 법 결과

Fig. 3의 A에서 볼 수 있듯이 정상군의 정자에서 발현되는 CatSper 단백질은 정자의 미부에 강하게 발현되는 것으로 확인되었다. Fig. 3의 B는 정자의 미부 전체에 존재하는 β -tubulin을 염색한 것으로 이는 미부를 구성하는 네 부분인 connecting piece, mid-piece, principal piece, end piece에 걸쳐 모두 존재하는 axoneme을 염색하여 미부 전체를 보여주고 있다. Fig. 3의 C는 정자의 두부에 존재하는 핵을 DAPI로 염색한 것으로 정자의 두부가 청색으로 관찰되고 있다. Fig. 3의 D는 A와 B를 중복시켜 보여줌으로써 CatSper 단백질이 미부의 connecting piece, mid-piece, principal piece에서만 발현되고 미부 최말단인 end piece에서는 발현되지 않는 것을 확인할 수 있다. Fig. 3의 E는 CatSper, β -tubulin 그리고 핵을 염색한 세 가지 상을 중복시켜 각각의 정확한 발현 위치를 나타낸 사진이다. Fig. 3의 F는 E의 흰색 사각형 부

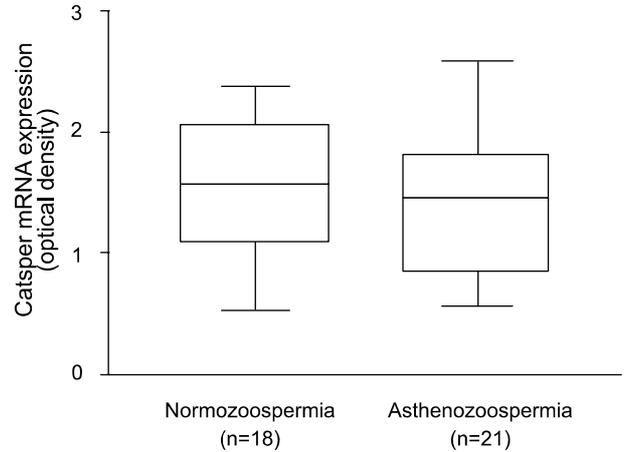


Fig. 2. Semi-quantitative analysis of CatSper mRNA expression in normozoospermia and asthenozoospermia.

분을 확대하여 관찰한 것으로 흰색 화살표가 가리키듯이 정자의 end-piece는 CatSper 면역반응 없이 β -tubulin 면역반응으로 녹색형광만 관찰되고 있다. 또한 극히 일부의 정자에서는 CatSper 단백질의 발현이 매우 적은 것이 관찰되었다. Fig. 3의 G와 H는 무력정자증군의 정자를 형광 면역 염색한 사진으로 정상군과 동일한 양상을 볼 수 있다.

고 찰

사정된 정자의 운동성과 수정능획득은 정상적인 수정을 위한 필수 인자라 할 수 있다. 특히 정자의 운동성은 사정된 정자가 난관을 거쳐 난자에 도달하기까지의 이동에 필수적이며, 또한 난자를 둘러싼 난구 세포층과 투명대를 뚫고 난자 세포막까지 도달하기 위한 물리적 힘을 제공한다.¹² 이와 더불어 침체반응을 통해 방출되는 여러 종류의 단백질 분해효소의 작용으로 투명대를 녹인다.¹³ 위에서 기술한 운동성과 침체반응에는 모두 칼슘 이온이 관여하는 것으로 알려져 있다. 정자의 세포막에는 여러 종류의 칼슘 채널이 존재하는 것으로 알려져 있으며,⁵⁻⁸ 몇몇 종류의 칼슘 채널들은 정자의 운동성이나 침체반응에 직접적으로 관여한다는 보고가 있다. 침체반응의 경우에는 투명대의 ZP3 단백질에 반응하여 low voltage-gated calcium channel과 TRP2가 세포질 내의 칼슘농도를 상승시키는 데 관여하는 것이 생쥐에서 밝혀졌다.^{8,14,15} 그리고 소에서는 편모에 특이적으로 존재하는 CNG에 의해서 칼슘의 유입이 매개되는 것이 보고되었다.⁷ 이처럼 칼슘 이온의 역할과 중요성에 대해서는 많은 연구가 이루어진 반면, 칼슘 채널의 역할과 그 분자생물학적인 기전에 관한 연구는 미비한 상태이다. 특히 침체반

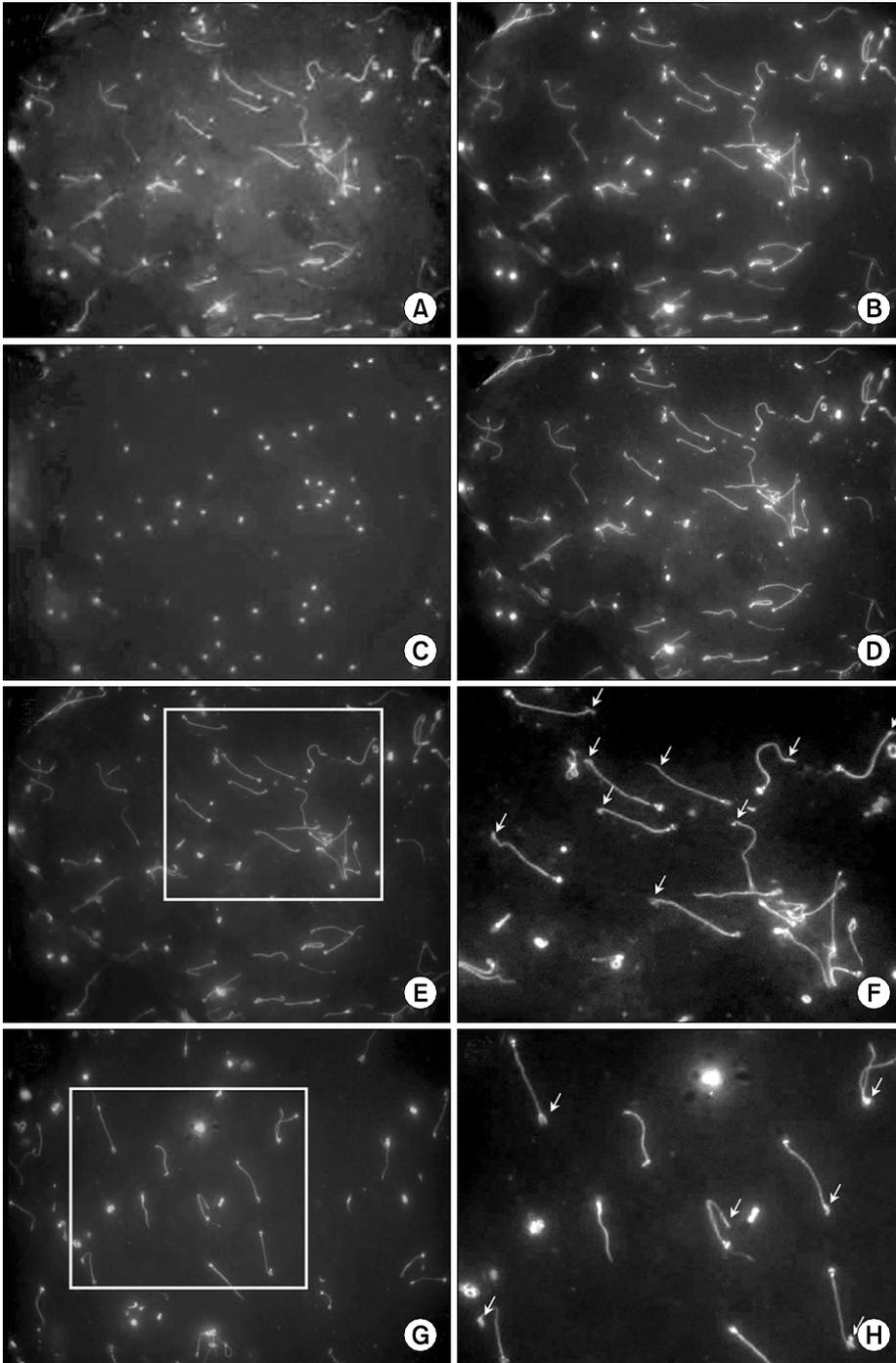


Fig. 3. Fluorescent immunocytochemistry for CatSper and β -tubulin of human spermatozoa in normozoospermia (A-F) and asthenozoospermia (G-H). A. CatSper (red), B. β -tubulin (green), C. DAPI (blue), D. merge A with B (orange), E. merge C with D (x200), F. 2-fold magnification of white box in E, G. merge CatSper, β -tubulin and DAPI in asthenozoospermia, H. 2-fold magnification of white box in G. White arrows indicate the end piece without CatSper immunoreactivity.

응의 연구에 비해 정자의 운동성에 관련된 칼슘 채널의 연구는 매우 부족한 실정이다. 따라서 정자 특이적 양이온 채널 CatSper가 정자의 운동성에 직접적으로 관여하여 불임을 초래할 수 있다는 것은 매우 흥미로운 사실이며, 사람의 정자를 대상으로 CatSper의 발현과 기능을 연구하는 것은 매우 의미 있는 시도라고 생각한다.

Ren 등⁹이 사람의 고환에서 추출한 RNA를 시료로 하여

CatSper의 mRNA가 존재함을 밝힌 이후, 2004년 Nikpoor 등¹⁶이 운동성이 있는 정자를 생산하는 폐쇄성 무정자증의 고환 조직과 운동성이 전혀 없는 정자를 생산하는 비폐쇄성 무정자증의 고환 조직에서 CatSper mRNA의 발현량을 반 정량적으로 비교한 결과, 비폐쇄성 무정자증군에 비해 폐쇄성 무정자증군에서 CatSper mRNA의 발현이 3.5배 높게 나타났다. 이는 사람에서 CatSper가 정자의 운동성에 관여할

가능성을 시사한다 할 수 있다. 그러나 고환에는 지주세포나 간질세포와 같은 체세포와 생식세포들이 함께 존재하고, 또한 여러 발생단계의 생식세포들이 모두 존재하기 때문에, 그 발현이 생식세포에 국한된 것인지 또는 생식세포라 할지라도 발생과정의 어느 단계에서 발현이 시작되는지 알 수가 없다. 본 연구에서는 총 39개의 정자시료 모두에서 CatSper mRNA의 발현을 확인할 수 있었다. 물론 사정된 정자는 mRNA로부터 단백질을 해독할 수 있는 능력을 상실한 상태이다. 그러나 이처럼 성숙이 완전히 끝난 정자에 CatSper mRNA가 존재한다는 것은 이 mRNA가 정자형성과정 중에 이미 전사되고 해독되어 CatSper 단백질을 생산하였다는 것을 의미하며, 이러한 사실은 CatSper 단백질이 정자형성과정의 최종단계인 정자의 미부에 존재한다는 본 연구 결과와도 일치한다 하겠다. 나아가서 CatSper 단백질이 성숙이 끝난 정자에 존재하면서 그 나름대로의 기능을 수행할 것이라는 예측을 가능케 한다. 이에 본 연구자들은 CatSper mRNA 발현량과 정자 운동성과의 상관관계를 분석하기 위하여 반정량적 분석(semi-quantitative analysis)을 시도하였으나 정상군과 무력정자증군 사이의 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 아마도 본 연구에서 분류한 무력정자증군 역시 정상군과 비교했을 때 60%의 높은 운동성을 보인 것에 기인할 것으로 생각한다. 따라서 운동성을 완전히 상실한 정자시료를 대상으로 하여 비교해 보는 것이 의미 있을 것으로 생각한다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 사람의 CatSper 단백질은 사정된 정자의 미부에서 발현되며, 이는 생쥐의 정자에서 CatSper가 미부의 principal piece에만 존재한다는 기존의 보고와 비교할 때 매우 유사한 것으로 사람의 CatSper 역시 정자의 미부에만 존재하면서 정자의 운동성에 관여할 가능성을 시사한다 하겠다. 그러나 이러한 가능성을 좀 더 명확히 하기 위해서는 사람의 정자를 대상으로 CatSper의 기능을 직접 연구하는 것이 필수적인 것이다. 예를 들어 칼슘 채널 blocker에 관한 연구를 통해 CatSper에 특이적인 blocker를 찾아 CatSper의 기능을 선택적으로 억제하거나, CatSper 유전자의 돌연변이를 연구함으로써, 돌연변이로 인한 CatSper 단백질 기능의 상실과 정자의 운동성 사이에 연관성을 알아보는 것이 필요할 것으로 생각한다. 이를 통하여 사람의 생식과정과 남성불임에 이해를 더할 수 있고, 특히 CatSper에만 특이적으로 작용하는 칼슘 채널 blocker에 대한 연구를 통해 새로운 남성 피임의 한 방법을 기대해 볼 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

본 연구는 사정된 사람의 정자를 대상으로 하여 정자 특이적 양이온 채널인 CatSper의 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 모두 확인한 최초의 보고이다. 특히 사람의 정자에서 발현되는 CatSper 단백질이 정자의 미부에 존재한다는 사실을 확인할 수 있었으며, 이는 생쥐의 경우처럼 사람에서도 CatSper가 정자의 운동성에 관여할 가능성을 시사한다.

REFERENCES

1. Eddy EM, O'Brien DA. The Spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press;1994;29-77
2. Eisenbach M. Sperm chemotaxis. Rev Reprod 1999;4:56-66
3. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. Front Biosci 2000;5:E110-23
4. Swann K, Whitaker MJ. Second messengers at fertilization in sea-urchin eggs. J Reprod Fertil Suppl 1990;42:141-53
5. Serrano CJ, Trevino CL, Felix R, Darszon A. Voltage-dependent Ca²⁺ channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. FEBS Lett 1999;462:171-6
6. Westenbroek RE, Babcock DF. Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha 1 subunits in sperm. Dev Biol 1999;207:457-69
7. Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. J Cell Biol 1998;142:473-84
8. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. Nat Cell Biol 2001;3:499-502
9. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 2001;413:603-6
10. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. World Health Organization. Cambridge University Press; 1999.
11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9
12. Cheon KW, Lee HS, Parhar IS, Kang IS. Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. Mol Hum Reprod 2001;7:447-52

13. Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994;189-317
 14. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6757-62
 15. Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13004-9
 16. Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, Ziaee SA, Tiraihi T. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod* 2004;19:124-8
-