

Methylmalonic Acidemia 가족의 유전자형 분석

아주대학교 의과대학 소아과
황진순 · 석효정 · 류경화 · 이은하 · 김성환

서 론

메칠말로닌산혈증 (MMA)은 methylmalonyl coenzyme A mutase나 조효소의 결손에 의해 발생하는 선천성 대사 이상 질환으로 상염색체 열성 유전 질환이다. Methylmalonyl -CoA mutase (MCM)의 결손에 의해 메칠말로닌산혈증이 나타날 경우 MCM의 활성이 완전히 없는 경우 (mut^0)와 활성도가 떨어져있는 경우 (mut^-)로 분류한다. 이환된 환자들은 전형적으로 케톤산혈증, 구토, 성장 부전 등의 증상을 신생아기에 나타낸다.

Mutase 유전자는 6p21.1에 위치하며 13개의 엑손으로 구성된다. 이 유전자는 32개의 아미노산 mitochondrial leader sequence를 가지는 750개의 아미노산 precursor 단백질을 암호화한다. leader sequence는 mitochondria 안에서 작용을 시작하고 mutase가 생산된다. mutase는 2개의 subunit로 구성된 homodimer로서 각 subunit에 아데노실코발라민 한 분자가 결합한다¹⁾.

현재까지 이 질환에 대해 현재까지 알려진 돌연변이는 50개 이상으로 유전자 연구가 활발하다. 그러나 아시아 지역에서는 일본에서 대부분의 돌연변이를 발표하였고 태국에서 돌연변이가 발견된 한 환자를 보고하였을 뿐이다²⁾. 이에 우리는 형제에서 메칠말로닌산혈증을 경험하였고 유전자 검사를 시행하여 2개의 새로운 돌연변이를 발견하였기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

대상

형제는 신생아기에 케톤산혈증, 구토, 기면 등의 증상을 나타내었고 소변 유기산 분석을 통해 메칠말로닌산혈증으로 진단되었다. 형제는 vitamin B12의 치료에 반응을 나타내지 않았다.

Enzyme assay

mut type을 결정하기 위한 생화학적 검사는 섬유아세포를 배양하여 시행하였다. 효소의 활성도는 D,L-[methyl-¹⁴C]-malonyl-CoA를 [¹⁴C]-succinyl-CoA로의 isomerization을 측정하여 결정하였다. 또, mut^- 와 mut^+ 를 구분하기 위해 [¹⁴C]-propionate into trichloroacetic acid-precipitable material를 culture media안의 [³H]-leucine과 다른 hydroxycobalamine과 비교하여 분석되었다³⁾. 두 환자에서 MCM 활성을 볼 수 없었으며 mut^0 type 이었다.

DNA analysis

Methylmalonyl CoA mutase (MCM) 유전자 분석은 부모와 환자들의 섬유아세포와 백혈구로부터 추출된 cDNA와 genomic DNA를 가지고 시행하였다. Total RNA는 Tri reagent를 사용하여 섬유아세포와 림프아세포로부터 추출되었고

First-strand cDNA는 Total RNA를 이용하여 만들었다. MCM cDNA는 RT-PCR 방법에 의해 증폭되었다. Direct sequencing은 아래와 같은 방법으로 시행되었다. 증폭된 MCM cDNA를 1% agarose gel에서 전기영동 분리하였다. 원하는 band를 gel로부터 분리한 후 glass power method에 의해 DNA를 얻었다. 정제된 template를 primer와 혼합한 후 DNA sequence를 통해 분석되었다. Allelic status를 확인하기위해 genomic DNA를 사용하여 mutase locus의 exon-specific PCR 산물의 direct sequencing이 시행되었다⁴⁾.

였다(G94E, R369C). 이 돌연변이는 새로운 돌연변이로 missense type 이었다(Fig 1).

G94E 돌연변이는 exon II에서 발견되었고 R369C는 exon VI에서 발견되었다. 이들 형제는 compound heterozyotes였다. 형제의 아버지는 n357에서 G->A로 base substitution에 의해 G94E aminoacid substitution을 가지는 heterozygote라는 것을 증명하였다. 형제의 어머니는 n1181C에서 C->T base substitution으로 R369C 돌연변이를 가지는 heterozygote였다. 형제는 H532R, V671I 유전자 다형성(polymorphism)을 가지고 있었으며 homozygote였다(Table 1).

결 과

형제에게서 동일한 종류의 돌연변이를 발견하

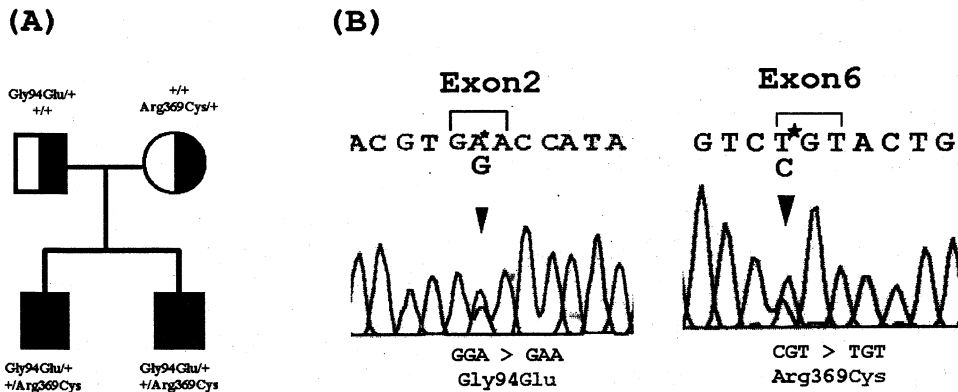


Fig. 1. Mutation analysis of the MCM gene (A) Pedigree of family. The carrier status for the two mutations is indicated above each individual;(+) wild type.(B) The patient shows a heterozygous missense mutation Gly94Glu in exon 2(left), and a heterozygous Arg369Cys in exon 6(right)

Table 1. Summary of mutations and polymorphisms in MMA brother

Patient	Enzyme study	Exon	Amino acid substitution	Base substitution	Polymorphism
Old	mut ^u	II	G94E	(Ht) 357G A	H532R(Hom)
		VI	R369C	(Ht)1181C T	V6711(Hom)
Young	mut ^u	II	G94E	(Ht) 357G A	H532R(Hom)
		VI	R369C	(Ht)1181C T	V6711(Hom)

고 찰

메틸말로닌산혈증은 드문 상염색체 열성 유전 질환으로 미토콘드리아 효소 methylmalonyl-CoA mutase를 암호화하는 유전자의 돌연변이에 의해 발생한다. 이 효소는 5-deoxyadenosylcobalamine을 보조 인자(cofactor)로서 요구한다. 따라서 메틸말로닌산혈증은 apoenzyme 또는 보조인자의 결손에 의해 발생할 수 있다. 메틸말로닌산혈증은 apoenzyme 활성도에 따라서 mut⁰ 또는 mut⁺ 두 가지의 subtype으로 분류되고 보조 인자 결손에 따라서 cbl A/B로 분류할 수 있다. 저자들이 보고한 형제는 apoenzyme 활성도가 없는 mut⁰ type이었다.

1990년에 첫 돌연변이가 보고⁵⁾ 된 이후로 현재까지 발표된 메틸말로닌산혈증의 돌연변이는 55개로 알려져 있으며 대부분이 missense와 nonsense type들이다. 아시아에서는 일본에서 몇 개의 돌연변이를 보고하였고^{6),7)} 태국에서 한명의 환자에서 2개의 새로운 2개의 돌연변이를 보고하였다²⁾.

저자들이 보고하는 형제에서 형은 현재 6세로 중등도 정신 지체를 보이고 있으나 동생은 현재 5세이며 정상이다. 환아들은 1년에 5-6회 정도 산혈증으로 입원하여 치료받는다. 형제 모두 신생아기에 출생과 함께 케톤산혈증, 구토, 기면 등의 메틸말로닌산혈증의 전형적 증상을 보였으나 동생은 형의 메틸말로닌산혈증 진단과 함께 출생 후 환아가 증상을 보이지마자 바로 대처를 하였기 때문에 지능의 손상이 형보다 경미한 것으로 생각되어진다.

Mutase는 크게 세 domain, cobalamin이 결합하는 G-terminus, CoA of methylmalonyl CoA가 결합하는 β/α barrel, 두 개의 MCM monomer들의 이분자체화 (dimerization)에 중요한 역할을

하는 N-terminus로 분류된다. 현재까지 알려진 돌연변이들은 대부분 CoA 또는 cobalamin binding domain에서 발견되었다¹⁾. 저자들이 보고한 형제에서 발견된 G94E 돌연변이와 R369C 돌연변이도 역시 CoA of methylmalonyl CoA가 결합하는 β/α barrel domain에서 발생한 것으로 효소 효과에 아주 중요한 작용을 가질 것으로 기대된다⁸⁾.

한국에서도 메틸말로닌산혈증이 간혹 발견된다. 한국의 메틸말로닌산혈증의 정확한 돌연변이 특성을 알기 위해서는 더 많은 환자들의 유전자 분석이 필요하다.

참 고 문 헌

- 1) Nham SU, Wilkemeyer MF, Ledley FD. Structure of the human methylmalonyl-CoA mutase (MUT) locus. *Genomics* 1990;8:710-6.
- 2) Champattanachai V, Shotelersuk V, Keeratchamroen S, Sawangareetrakul P, Srisomsap C, Svasti J, et al. Novel mutations in a Thi patient with methylmalonic acidemia. *Mol Genet Metab* 2003;79:300-2.
- 3) Willard HF, Ambani LM, Hart AC, Mahoney MJ, Rosenberg LE. Rapid prenatal and postnatal detection of inborn errors of propionate, methylmalonate, and cobalamin metabolism: A sensitive assay using cultured cells. *Hum Genet* 1976;34:277-83.
- 4) Berger I, Shaag A, Anikster Y, Baumgartner ER, Bar-Mier M, Joseph A, et al. Mutation analysis of MCM gene in Israeli patients with mut⁰ disease. *Mol Genet Met* 2001;73:107-10.
- 5) Jansen R, Ledley FD. Heterozygous mutations at the mut locus in fibroblasts with mut⁰ methylmalonic acidemia identified by polymerase-chain-reaction cDNA cloning. *Am J Hum Genet* 1990;47:808-14.
- 6) Ogasawara M, Matsubara Y, Mikami H, Narisawa K. Identification of two novel mutations in the methylmalonyl-CoA mutase

- gene with decreased levels of mutant mRNA in methylmalonic acidemia. *Hum Mol Genet* 1994;3:867-72.
- 7) Mikami H, Ogasawara M, Matsubara Y, Kikuchi M, Miyabayashi S, Kure S, et al. Molecular analysis of methylmalonyl-CoA mutase deficiency: Identification of three missense mutations in *mut*⁰ patients. *J Hum Genet* 1999;44:35-9.
- 8) Peters HL, Nefedov M, Lee LW, Abdenur JE, Chamoles NA, Kahler SG, et al. Molecular studies in mutase-deficient (MUT) methylmalonic aciduria Identification of five novel mutations. *Hum Mutat* 2002;20:406-10.