

유전성 대사 질환의 효소 분석 진단: (1) 갈락토오스혈증

녹십자 의료재단

양송현 · 이은희 · 문해란

1. 유전성 대사 질환

유전성 대사 질환이라 함은 생명 현상에 필요한 물질 대사가 태어날 때부터 비정상적이어서 대사되어야 할 물질이 인체에 축적되고, 축적된 물질로 인하여 인체의 기능 장애가 발생하게 되는 질환을 일컫는다. 물질의 분해 및 합성, 즉 대사 과정에는 특정 효소가 관여하는 바, 유전성 대사 질환의 경우 유전적 결함으로 인하여 이 효소가 결핍되게 되며, 보통 상염색체 열성으로 유전된다.

유전성 대사 질환의 진단은, 차단된 대사 과정으로 인하여 분해되지 못하는 물질의 축적과 생성되어야 할 물질의 존재 여부를 측정하거나, 해당되는 효소의 활성도를 측정하거나 유전자 분석을 통하여 이루어진다. 이러한 진단 방법 중에서, 효소 분석은 효소의 활성도를 정량화 할 수 있다는 점에서 유전자 분석을 통한 진단과 함께 임상적으로 중요한 의의를 갖는다고 할 수 있다.

2. 갈락토오스혈증(Galactosemia)의 효소 분석 진단

2.1 갈락토오스혈증의 개요

갈락토오스혈증(Galactosemia)은 상염색체 열

성으로 유전되는 선천성 대사 이상 질환의 하나이며, 발생 빈도는 출생아 50,000 - 60,000 명 중 한 명으로 알려져 있다.

일반적으로 우유 등과 같은 유제품(모유 포함)을 섭취하면, 그 주성분인 락토오스는 체내에서 글루코오스와 갈락토오스(유당, 乳糖)로 분해된다. 이렇게 분해된 글루코오스는 인체 내에서 직접적인 열원으로 쓰이게 되며, 갈락토오스 역시 에너지원으로 사용되기 위해 분해와 같은 대사 과정을 거치게 된다. 이때, 갈락토오스의 대사 과정에 관계하는 유전자가 변이 등의 이유로 완전히 못하면, 분해 등에 반드시 필요한 효소가 결핍되게 된다. 이러한 원인으로 완전히 분해되지 못한 갈락토오스와 그 대사산물이 체내에 축적되어 생후 즉시부터 황달, 구토, 설사 증상과 발육 부전 현상을 보일 뿐만 아니라, 적절한 치료가 이루어지지 않으면 간경변, 백내장, 정신 지체 등의 증상을 보이며 사망에 이르게 되는 질환이다.

2.2 갈락토오스혈증의 분류

갈락토오스의 대사 과정은 아래 그림과 같으며, 갈락토오스혈증은 결손 효소와의 관계에서 다음과 같이 세 가지로 나뉘어 진다:

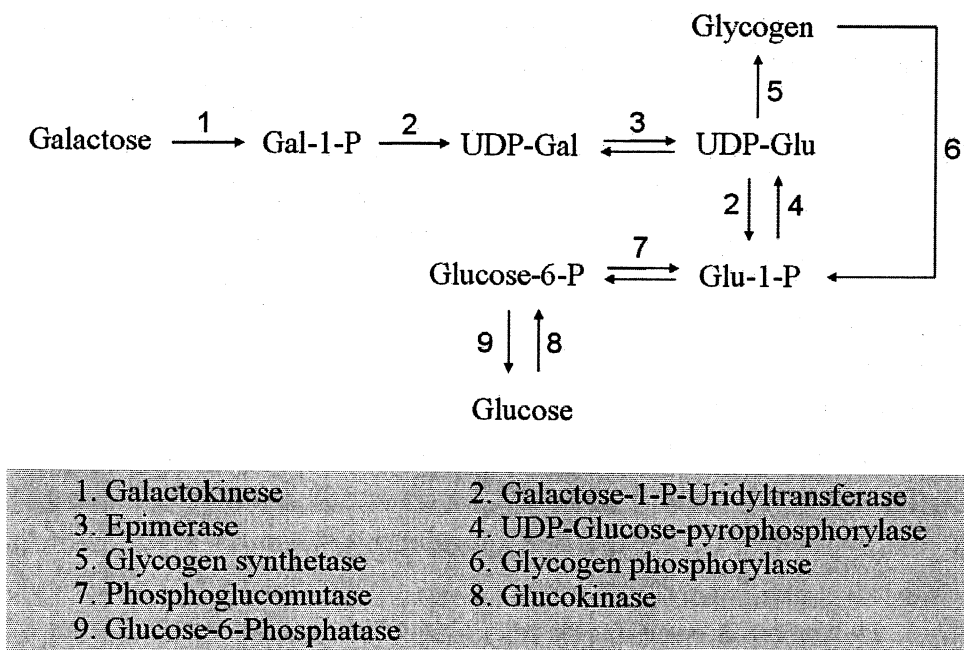


Fig. 1. Metabolism of Galactose

2.2.1 Galactokinase (약칭: GALK) deficiency
 Galactose를 Galactose-1-phosphate로 전환시키는데 관여하는 효소인 Galactokinase의 결핍으로 인하여 Galactose가 체내에 축적되며, 아울러 그 대사 산물인 Galactitol의 축적을 유발시킨다. Classic Galactosemia보다는 심하지 않으나, 일반 수유를 계속하게 되면 백내장이 발생하게 되며, 대체적으로 간 및 신경 장애는 나타나지 않는다.

하고 보편적이다. 증상으로는 황달, 구토, 빈약한 체중 증가, 수유 곤란, 보챌, 경련, 저혈당 등의 증세를 보이며. 계속되는 일반 수유시, 간경변과 백내장, 그리고 감염에 대한 저항력의 저하로 인한 패혈증, 정신 지체 등이 발생하고, 여아의 경우에는 조기 난소 부전이 올 수 있다. Lactose-free diet를 해야 하며, 양수 배양 세포 또는 용모막 세포로 산전 진단도 가능하다.

2.2.2 Galactose-1-Phosphate-Uridyltransferase (약칭: GALT 또는 UT) deficiency

GALT는 주로 Galactose-1-phosphate의 분해에 관여하며, 이 GALT의 결핍으로 인하여 체내에 Galactose-1-phosphate가 축적되어, 간, 신장, 뇌의 선조직 세포에 이상이 생기게 된다. Classic Galactosemia라고 불리며, 임상 증상이 가장 심

2.2.3. UDP-Galactose-4-Epimerase(약칭: GALE) deficiency

GALE는 UDP-galactose와 UDP-glucose의 상호 전환 과정에 관계하는 효소로서, 결핍되면 적혈구 내의 Galactose-1-phosphate의 농도가 높아진다. GALE가 혈액에만 결핍되는 경우 (benign form)에는 특이한 병적 현상은 나타나지

않으나, severe form의 경우, 즉 GALE가 혈액과 간 등의 조직에서도 결핍되는 경우에는 Classic Galactosemia와 유사한 증세를 보이며, 부가적으로 sensorineural deafness와 cataract를 보이기도 한다.

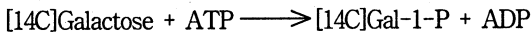
3. 검사방법

채혈지를 이용한 선별검사에서 정상 범위 이상의 Galactose(total)를 보이는 환자는 재검을 하게 되며, 재검에서도 역시 정상 범위 이상의 결과를 보인다면, Galactosemia일 가능성이 매우 높기 때문에 적절한 치료를 위하여 효소의 활성도를 측정하는 확진 검사가 조속히 이루어져야 한다. 검체는 위의 세 가지 효소 측정을 위하여 Whole Blood EDTA 3-5 mL 정도가 필요하며, 채혈 후 실온 조건에서 익일 도착될 수 있도록 하면 검사에 큰 지장이 없다. 검사 과정은 다음과 같다

3.1. Galactokinase(EC. 2.7.1.6) Assay

3.1.1 원리

galactokinase



Galactokinase의 분석에는 galactose가 erythrocyte에 존재하는 galactokinase에 의하여 galactose-1-phosphate로 대사되는 원리를 이용한다. 방사성 동위 원소 $[14C]$ 으로 표지된 galactose를 검체에 ATP와 함께 첨가하여 반응시키면 세포 내에 존재하는 galactokinase에 의하여 $[14C]Gal-1-P$ 와 ADP로 변환된다. 이 반응의 생성물인 Gal-1-P의 검출은 DEAE (Diethylaminoethyl)-cellulose(0.90 mEq/g solid) column을 이용한다.

3.1.2 필요 시약

- 1) Tris-HCl buffer(1mol/L, pH 8.1)
- 2) Saponin(1%)
- 3) $[14C]$ galactose(5 μ Ci/mL)
- 4) Galctose(10 mmol/L)
- 5) NaF(50 mmol/L)
- 6) MgCl(100 mmol/L)
- 7) ATP(37.5 mmol/L)

3.1.3 검사 과정

1) 검체의 전처리

전혈을 생리 식염수로 2-3회 세척하여 erythrocyte를 분리한다. 분리된 erythrocyte 중 galactokinase assay용 검체는 약간의 생리 식염수를 넣어 냉장 보관(4 $^{\circ}C$, 1-2 일 정도 가능)하거나, 당일 생리 식염수로 2배 희석하여 바로 테스트한다.

2) 시약의 조제

위 1-3항에서 언급된 시약들은 ATP를 첨가하지 않은 상태로 미리 혼합한 후, 냉동시켜 비교적 오랜 기간 동안(약 6 개월) 사용할 수 있다. ATP는 실험 직전 위 혼합물 4 portion 대 1 portion의 비율로 첨가하여 최종 reaction mixture로 사용한다.

3) 테스트

saline으로 2배 희석한 sample로부터 1.5 mL eppendorf tube 3개에 각각 50 μ L 씩 분주한 후, 그 중 하나는 reaction mixture를 주입하기 전에 95 $^{\circ}C$ 에서 5 분간 denaturation하여 blank로 사용한다. 이 과정 후 각각 100 μ L 씩의 reaction mixture를 주입하여 37 $^{\circ}C$ 에서 30 분간 반응시킨 뒤 95 $^{\circ}C$ 에서 5 분간 가열하여 반응 과정을 종료시킨다.

4) column

반응이 종료된 시료들을 냉각시킨 뒤 5 분 간 900g로 원심 분리하여 상층부 액 90 μ L 씩 을 준비된 DEAE-cellulose column에 옮긴 후, 총 12 mL(2 mL \times 6회)의 H₂O (2차 증류수)로 galactose fraction을 washing한다. 이 washing 과정이 끝나면 150 mM의 HCl (총 5 mL)로 Gal-1-P fraction을 20 mL vial에 수집하고, 같은 양의 scintillation fluid를 넣어 잘 혼합한 뒤 β -counter에서 측정한다.

이 과정은 neutral sugar인 galactose는 chloride form인 DEAE-cellulose에 결합하지 않기 때문에 H₂O로 세척하여 제거시키고, cellulose에 결합된 monophosphate 즉 Gal-1-P를 150 mM의 HCl로 분리시키는 원칙을 이용한 것이다.

3.1.4 Galactokinase Activity의 계산

$$\frac{(\text{sample cpm} - \text{blank cpm}) \times \text{galactose (nmol/100 } \mu\text{L)}}{100 \% \text{ cpm} \times \text{incubation time(30 min)} \times \text{g Hb}}$$

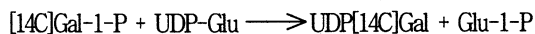
3.1.5 Reference range

Galactokinase activity는 negative일 경우, 신생아일 때는 80 - 120 nmol/min/g Hb 이상을 나타내며, 출생 후 1개월부터 급격히 감소하여 12개월 쯤부터는 약 20 - 30 nmol/min/g Hb 정도를 보인다.

3.2. Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase (EC.2.7.7.12) Assay

3.2.1 원리

transferase



Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase의 분석은 erythrocyte에 존재하는 transferase에 의하여 Gal-1-P가 UDP-Gal로 대사되는 원리를 이용하여, 양수 배양 세포 또는 용모막 세포로 산전 진단도 가능하다. 이 대사 과정에서 방사성 동위원소 [¹⁴C]로 표지된 Gal-1-P는 UDP-[¹⁴C]Gal로 변환되며, 이 생성물은 galactokinase의 분석에서의 마찬가지로 DEAE-cellulose column을 이용하여 검출한다.

3.2.2 필요 시약

- 1) Glycine-NaOH buffer(1 mol/L, pH 8.7 for erythrocyte, pH 8.2 for tissue)
- 2) Cysteine-HCl(0.2 mol/L, pH 8.7 for erythrocyte, pH 8.2 for tissue)
- 3) Galactose-1-phosphate(50 mmol/L)
- 4) [¹⁴C]galactose-1-phosphate(3.75 μ Ci/mL for erythrocyte, 10 μ Ci/mL for tissue)
- 5) UDP-glucose(25 mmol/L)

이상의 시약들은 냉동 보관 하여 여러 번 사용할 수 있다.

3.2.3 검사 과정

1) 검체의 전처리

생리 식염수로 세척하여 erythrocyte를 분리한 뒤 -20 $^{\circ}$ C 이하로 냉동 보관 하거나, 2차 증류수로 5배 희석하여 테스트에 사용한다. Tissue의 경우 2차 증류수로 sonication하며, protein 함량은 0.2 - 1.5 mg/mL 정도가 적절하다.

2) 시약의 조제

필요한 시약 전체를 10 portion으로 하여, 1) Glycine-NaOH buffer(1 mol/L, pH 8.7): 5 portion, 2) Cysteine-HCl(0.2 mol/L, pH 8.7): 2 portion, 그리고 나머지 substrate 3), 4), 5)는 각

각 1 portion의 비율로 조제한다. Tissue의 경우 그 비율은 1) 4 portion, 2) 2 portion, 3) 1 portion, 4) 2 portion, 5) 1 portion으로 변화된다.

3) 테스트

2차 중류수로 5배 희석한 sample로부터 1.5 mL eppendorf tube 3개에 각각 75 μ L 씩 분주한 후, 그 중 하나는 reaction mixture를 주입하기 전에 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 denaturation하여 blank로 사용한다. 이 과정 후 reaction mixture를 각각 75 μ L 씩 주입하고 37 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응시킨 뒤 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 가열하여 반응 과정을 종료시킨다.

4) column

반응이 종료된 시료들을 냉각시킨 뒤 Galactokinase assay의 경우와 같이 원심 분리하고 상층부액 80 μ L를 준비된 DEAE-cellulose column에 옮긴 후, 총 12 mL(2 mL \times 6회)의 25 mmol/L의 HCl로 monophosphate fraction을 washing한다. 이 washing과정이 끝나면 150 mM의 HCl (총 5 mL)로 diphosphate fraction(UDP-Gal)을 20 mL vial에 수집하고, 같은 양의 scintillation fluid를 넣어 잘 혼합한 뒤 β -counter에서 측정한다.

* monophosphate: cellose에 비흡착 --- 낮은 농도의 HCl로 세척

* diphosphate: cellose에 흡착 --- 높은 농도의 HCl로 분리

3.2.4 Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase activity의 계산

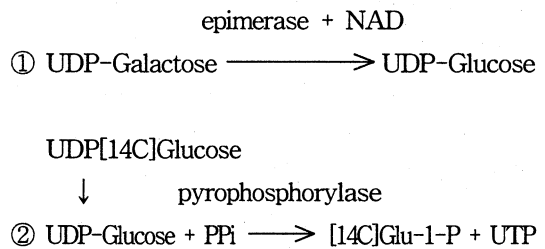
$$\frac{(\text{sample cpm} - \text{blank cpm}) \times \text{Gal-1-P in } 75 \mu\text{L}(5 \mu\text{mol})}{100 \% \text{ cpm} \times \text{incubation time}(20 \text{ min}) \times \text{g Hb or mgProt/mL}}$$

3.2.5 Reference range(μ mol/h/g Hb)

정상 범위(N/N): 20-35, Duarte-2 Variant (D2/N): 15-19, heterozygote(G/N): 9-14, compound heterozygote(D2/G): 4-6

3.3 UDP-Galactose Epimerase(EC. 5.1.3.2) Assay

3.3.1 원리



Epimerase의 분석은 2 단계의 반응을 통하여 이루어진다. 1차 반응에서는 세포 내에 존재하는 epimerase에 의해 UDP-galactose가 UDP-glucose로 전환되고, 2차 반응에서는 이 생성물이 방사성 동위 원소[14C]로 표지된 UDP-glucose와 결합된 뒤 함께 첨가되는 pyrophosphorylase에 의하여 Glucose-1-P로 전환된다. 검출은 galactokinase의 분석에서와 마찬가지로 DEAE-cellulose column을 이용한다.

3.3.2 필요 시약

- 1) Glycyl-glycine buffer(1 mol/L, pH 9.0)
- 2) UDP-galactose(14 mmol/L)
- 3) NAD(15 mmol/L)
- 4) Tris-HCl buffer(1 mol/L, pH 7.6)
- 5) UDP-[14C]glucose(2 μ Ci/mL)
- 6) Pyrophosphate(0.75 mmol/L)
- 7) MgCl(0.1 mol/L)
- 8) UDP-glucose standards(0.05, 0.1 mmol/L)

in 2.5 mmol/L UDP-Gal

9) UDP-glucose pyrophosphorylase(20 U/mL)

이상 언급된 시약들은 냉동 보관하여 수개월간 사용할 수 있다. 시약 2)와 9) 그리고 3), 6), 8)은 매우 고가이거나 예민하기 때문에 2회 정도 사용할 수 있는 양으로 소분하여 보관하는 것이 효율적이다.

3.3.3 검사 과정

1) 검체의 전처리

Epimerase 테스트를 위한 검체의 전처리는 Erythrocyte의 경우 Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase의 분석을 위한 방법과 동일하다. Cataract증상을 보이는 경우에 각막 세포로 효소 분석을 시도할 수 있으며, 이 경우 2차 증류수로 sonication하고 적절한 protein 함량은 1 mg/mL이다.

2) 시약의 조제

1차 반응에서는 Glycyl-glycine buffer(0.7 mol/L, pH 9.0), UDP-galactose(14 mmol/L) NAD(15 mmol/L)을 동일한 비율로 혼합하여 사용한다. Blank는 NAD(15 mmol/L)대신 2차 증류수를 첨가한다. 2차 반응에서는 Tris-HCl buffer(1 mol/L, pH 7.6), MgCl(0.1 mol/L), H₂O (2차 증류수)는 각각 2 portion, UDP-[14C] glucose(2 µCi/mL)와 Pyrophosphate(0.75 mmol/L)은 1 portion의 비율로 조제한다.

3) 테스트

① 약 4 °C로 냉장시킨 2차 증류수 1 L에 Glycyl-glycine buffer(1 mol/L, pH 9.0)를 1mL 첨가한 후 잘 혼합하고 여기에 5 배 희석한 검체 약 300 µL 정도를 dialysis tube(pore

diameter ca. 25 Å)에 넣어 약 1 시간 가량 투석한다.

② 투석된 검체를 각각 12 µL 씩 1.5 mL eppendorf tube 5 개에 분주하고, 이 중 2 개는 blank로 구분하여 조제된 시약을 주입하고 15 분간 37 °C에서 반응시킨 뒤, 95 °C에서 5분간 가열하여 1 차 반응을 종료시킨다.

③ 1 차 반응된 시료를 냉각시킨 후 원심 분리하여 새로운 1.5 mL eppendorf tube에 25 µL 옮기고, 2차 반응 시약을 주입하여 15분간 37 °C에서 반응시킨 뒤, 95 °C에서 5분간 가열하여 2 차 반응을 종료시킨다.

4) column

2차 반응이 종료된 검체들을 냉각시킨 후, 냉동 보관하거나 원심 분리하여 상층부 액 100 µL 씩을 준비된 DEAE-cellulose column에 옮긴 후, Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase의 분석에서의 동일한 방법으로 세척 및 수집한 후, 같은 양의 scintillation fluid를 넣어 잘 혼합한 뒤 β-counter에서 측정한다.

3.3.4 UDP-Galactose Epimerase activity의 계산

$$\frac{(\text{sample cpm} - \text{blank cpm}) \times 0.1 \mu\text{mo/mL} \times \text{dilution factor}(5)}{(0.1 \text{ mmol UDP-Glu cpm} - 0 \text{ cpm}) \times \text{incubation time}(1/4 \text{ h}) \times \text{g Hb or mgProt/mL}}$$

3.3.5 Reference range(µmol/h/g Hb)

정상 범위: 19-35, heterozygote: 12-18, homozygote: 4-8

4. 검사 결과

녹십자 의료재단에서는 2003년 12월부터 Galactosemia의 3 가지 효소의 분석 진단을 해오고 있으며, 2004년 4월까지 약 80 건의 검사를 행한 결과는 다음과 같다.

- 1) Galactokinase
 - * heterozygote: 2 cases
- 2) Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase
 - * duarte-2 variant: 2 cases
 - * heterozygote: 3 cases
- 3) UDP-Galactose Epimerase
 - * homozygote: 1 case
 - * heterozygote: 4 cases

5. 정도 관리

이상의 내용에서 볼 수 있듯이, 효소 분석 진단은 그 검사의 특성상 많은 부분을 manual test에 의존 할 수밖에 없으며, 검사 조건에 매우 민감하고 반응한다. 그러므로 매 테스트마다 known control sample을 같이 검사하고 그 결과를 비교 분석하여 정도 관리의 지표로 삼는 것이 반드시 필요하다. 또한 신뢰성 높은 검사 결과를 보장받기 위해서는 무엇보다도 일련의 검사 과정에 대한 부단한 관리와 감독이 필요하며, 이를 위해서는 고도로 숙련된 전문성이 뒷받침되어야 한다.

6. 맺음말

신생아 선별검사 후에 행해지는 효소 분석 진단을 통하여, 다수의 heterozygote form 이외에,

생후 20일된 신생아(2003/10/25 생, 2003/11/16 검사)의 Epimerase 결핍 사례(Gal-1-P concentration: 7.0 mg/dL, Epimerase activity: 5.1 $\mu\text{mol/h/g Hb}$)를 조기에 진단하여, 적절한 식이 요법 치료를 가능케 한 경우에서 볼 수 있듯이, 효소 분석 진단은 상대적으로 짧은 시간에 비교적 높은 정확도를 갖는 진단 결과를 제공할 수 있다는 점이 그 장점이라고 할 수 있다. 그러나 완전한 진단을 위하여, 더 나아가 가족의 유전적 상황 등을 파악하기 위해서는 유전자 분석과 함께 진단되어야 임상적 가치가 증대될 것이라고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Scriver CR, Childs B, Beaudet AL, Kinzler KW, Sly WS, Vogelstein B, Valle D. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001:1553-87.
- 2) Shin-Podscarbi, et al. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics, London: Wiley-Liss, Inc. 1991:267-83.
- 3) Strohmeyer G, Stremmel W, Niederau C. Angeborene Stoffwechsel-Erkrankungen. Landsberg/Lech, Ecomed Verlagsgesellschaft AG. 2002:44-52.
- 4) Brivet M, Migayron F, Roger J, Cheron G, Lemonnier A. Lens hexitols and cataract formation in a woman heterozygote for galactosemia. J Inherit Metab Dis 1989;12 Suppl 2:343-5.
- 5) Garibaldi L, et al. Galactosemia caused by generalized uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. J Pediat 1986;109:1074-5.
- 6) Zabransky S. Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen. Wien. Springer Verlag. 2001:226-49.