

리소좀 교통 이상을 초래하는 뮤코지방증 2형과 3형 환자의 섬유아세포를 이용한 신규 유전자 탐색 및 돌연변이에 대한 연구

송승미, 장수희*, 백경훈, 진동규
성균관 대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과 삼성생명과학연구소*

≡ Abstract ≡

A Study on the Screening of the Novel Genes Associated with Lysosomal Trafficking and Mutation Detection in Fibroblasts of the Patients with Mucopolidosis type II and III

Seng Mi Song, Soo Hee Chang*, Kyung Hoon Paik, Dong-Kyu Jin
Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University, School of Medicine,
Clinical Research Center, Samsung Biomedical Research Institute*

Purpose: To understand genetic differences and similarities between mucopolidosis and control.

Methods: Using the fibroblast of the mucopolidosis II and control, forward and reverse subtracted libraries were constructed. Among these clones, we investigated mutations in the GNPTA (MGC4170) gene, which codes for the α/β subunits of phosphotransferase, and in the GNPTAG gene, which codes for the γ subunits in 5 Korean patients with mucopolidosis type II or IIIA.

Result: Several differentially expressed cDNAs were cloned and their sequences were determined. Mutation analysis of the interested gene, GNPTA was performed and we identified 7 mutations in the GNPTA gene, but none in the GNPTAG gene. The mutations in type II patients included p.Q104X(c.310C>T), p.R1189X(c.3565C>T), p.S1058X(c.3173C>G), p.W894X(c.2681G>A) and p.H1158fsX15(c.3474_3475delTA), all of which are non-sense or frame shift mutations. However, a

splicing site mutation, IVS13+1G>A (c.2715+1G>A) was detected along with a non-sense or a frame shift mutation (p.R1189X or p.E858fsX3(c.2574_2575delGA)) in two mucopolipidosis type IIIA patients.

Conclusion: This report shows that mutations in the GNPTA gene coding for the α subunits of phosphotransferase, and not mutations in the GNPTAG gene, account for most of mutations found in Korean patients with mucopolipidosis type II or IIIA.

Key Words: mucopolipidosis type II, mucopolipidosis type III, phosphotransferase, mutation detection, GlcNAc-phosphotransferase, GNPTA, MGC4170

서론

리소좀 축적병은 리소좀 내에서 단백이나 지질을 분해하는 효소가 결핍된 단일 유전자의 이상에 의한 유전병으로서, 대개 청소년기 이전에 급격한 노쇠와 퇴행성 기능 저하를 보이다가 사망하는 희귀 난치성 질환이다. 이 질환의 치료에 효소 보충법의 치료법이 등장하게 되었고, 현재 Gaucher병, 뮤코다당체 침착증 I형, II형, 당원병 II형, Fabry병 등의 임상 치료에 사용되고 있다.

리소좀 축적병 중의 하나인 뮤코지방증 II형 (mucopolipidosis II, I-cell disease)에서는 Hurler 증후군과 유사하나 mucopolysacchariduria가 없고, 큰 phase-dense inclusion을 관찰할 수 있으며, 뮤코지방증 III형(mucopolipidosis III, pseudo-Hurler polydystrophy)에서도 유사한 inclusion을 관찰할 수 있는데 이는 II형보다 임상 증상이 경하다. 리소좀 축적병의 가장 심한 형태인 뮤코지방증 II형과 III형은 인구 수백만 명당 한 명 꼴로 발견되는 매우 드문 질환으로서, 리소좀 효소의 인산화에 관여하는 N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase의 결함에

의한다.

배양한 뮤코지방증 II형 섬유아세포에서 여러 acid hydrolase의 결함을 관찰했고, 그 중 많은 부분이 세포 배양액과^{1, 2)} 환자의 혈장과 체액에서의 증가로 관찰되었다³⁾. 또한 정상적인 섬유아세포에서 방출된 리소좀 효소는 I cell 섬유아세포에서의 흡수가 가능하나, I cell 섬유아세포에서 과도하게 방출된 효소는 정상적인 섬유아세포에 의해 흡수될 수 없음을 보고하였다⁴⁾. 이는 리소좀 효소가 흡수나 운송에 필요한 marker를가지는데 I cell 섬유아세포에서는 marker를 가지지 못하기 때문이며⁵⁾, 그 marker는mannose 6-phosphate(M6P)임이 밝혀졌다^{6, 7)}. 합성된 리소좀 효소는 ER에서 N-oligosaccharide가 부착되며⁸⁾, 후에 골지에서 M6P가 첨가되는데 이 과정에서 두 개의 효소가 관여한다. 첫 번째 효소인 N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-phosphotransferase)는 high-mannose oligosaccharide chain의 mannose 6에 α -N-acetylglucosamine-1-phosphate의 첨가 기능을 가지며, 두 번째로 관여하는 효소인

N-acetylglucosamine-1-phosphodiester- α -N-acetylglucosaminidase (UDP-N-acetylglucosamine)는 N-acetylglucosamine을 제거하여 mannose-6-phosphate를 노출시키는데 작용한다. 뮤코지방증 II와 III에서는 전자가 결핍되어 리소좀 효소들은 M6P를 부착하지 못하고 분비 경로에 들어가며⁹⁾, 그 결과 뮤코지방증 환자의 혈액 내 리소좀 효소가 과다하게 관찰된다²⁾. 이 GlcNAc-phosphotransferase는 효소 활성과 인식 부위가 서로 다른 subunit에 존재하며¹⁰⁾, 효소활성과 효소 인식에 각각 관여하는 α/β subunit과 γ subunit은 별개의 cDNA에 코딩된다¹¹⁾.

본 연구에서는 subtractive hybridization으로 뮤코지방증의 메커니즘 규명에 도움이 되는 신규 유전자를 탐색하였다. 또한 그 결과물로 관심 유전자인 GlcNAc-phosphotransferase α/β subunit에 해당하는 MGC4170의 돌연변이를 동정하였다. GlcNAc-phosphotransferase의 γ subunit에는 돌연변이에 관한 보고는 있으나 α/β subunit에서의 돌연변이 조사는 이루어진 바 없기에, 본 논문에서 밝히는 GlcNAc-phosphotransferase의 α/β subunit의 돌연변이 연구는 뮤코지방증 연구에 중요한 단서를 제공할 것이다.

대상 및 방법

1. 대상

다섯 가계로부터의 다섯 proband가 이 연구에 등록되었으며, 모든 환자는 한국인이고 임상적으로 2002년부터 2004년 까지 삼성 병원 소아과에서 진단을 받았다. 임상적 소견과 혈장에서 리소

좀 효소의 증가라는 실험적 결과(Women's & Children's Hospital Adelaide의 화학 병리과에서 수행되었음)와 GlcNAc-phosphotransferase의 활성도로부터 내린 진단에 근거하여 뮤코지방증 유형 II나 유형 III로 구별하였다(Table 1, 2). GlcNAc-phosphotransferase 활성도는 Dr Kudo M와 Dr. Canfield WM (Genzyme Glycobiology Research Institute, Oklahoma)에 의하여 섬유아세포 lysate에서 직접 측정되었다. 이 assay는 [β -³²P]-UDP-GlcNAc가 α -methylmannoside로 GlcNAc 1-phosphate를 수송하는 정도를 측정한다. 뮤코지방증 III형인 4, 5번 환자의 섬유아세포를 같은 나이인 대조군 환자 두 명을 측정한 경과, 0.016, 0.015, 0.72 and 0.83 pmol/hr/mg의 값을 가졌으며 이는 정상 대조군의 섬유아세포 (GM05565, 0.92 pmol/hr/mg)의 1.8, 1.7, 77.7 and 90.3 % 의 값에 해당한다. 뮤코지방증 IIIA의 활성도 값이 1.7-1.8%에 해당하므로 환자 4, 5는 뮤코지방증 IIIA로 진단되었다. 뮤코지방증 II형(환자 1,2,3)은 섬유아세포 배양의 어려움으로 위와 같은 방법으로 측정할 수 없었다. 그러나 혈장에서의 리소좀 효소의 증가와 mucopolysacchariduria가 없으며 섬유아세포에서 inclusion body가 관찰되어 뮤코지방증 II으로 진단하였다. 본 연구는 임상 시험 심사 위원회의 승인을 거쳐 환자와 보호자의 동의서를 받아 시행되었다.

Table 1. Clinical summary of the patients

Patients	Type	Age at diagnosis	Clinical manifestations
1	II	1.6 yrs	growth retardation, developmental delay, hypotonia, severe skeletal deformity, gum hypertrophy, severe mitral and aortic valve regurgitation with prolapse, hip subluxation
2	II	2.3 yrs	growth retardation, developmental delay, craniofacial anomaly, skeletal dysplasia
3	II	1.4 yrs	growth retardation, developmental delay, coronary artery atresia, gum hypertrophy, joint restriction, coxa valga
4	IIIA	11yrs	no growth retardation, normal intelligence, mild coarse face, mild restricted joint movement, thenar muscle hypotrophy,
5	IIIA	8yrs	borderline growth retardation, normal intelligence, mild coarse face, mild restricted joint, claw hand, toe walking, hip subluxation, coxa valga

Table 2. Serum lysosomal enzyme activities (nmol/min/mL) and GlcNAc phosphotransferase activity (pmol/hr/mg, skin fibroblast) in 5 mucopolidosis patients

Patient No	1	2	3	4	5	Reference value
β -hexosaminidase(total)				290	210	7.5-4.1
β -hexosaminidase A	19	20	20	14	14	0.5-3.1
β -glucuronidase	23	26	22	14	18	0.1-2.0
α -fucosidase	125	104	70	75	65	2.0-25
α -mannosidase	65	64	50	52	52	0.5-3.0
Arylsulphatase A	51	51	6.4	33	42	0.1-1.6
α -Nac-galactosaminidase	*	12	*	8.0	9.0	0.1-0.6
GlcNAc-phosphotransferase activity	*	*	*	0.016 (1.8% of normal control)	0.015 (1.7% of normal control)	

* not available

2. 방법

1) Subtractive hybridization을 사용한 subtracted cDNA libraries의 구축

Subtractive hybridization은 PCR-Select™ cDNA subtraction kit (Clontech Laboratories Inc, USA)의 manufacturer의 recommendation에 준해 수행하였다. Forward hybridization에서 뮤

코지방증 환자는 tester로서, 정상군은 driver로서 사용되었다. reverse hybridization에서는 정상군이 tester, 뮤코지방증 환자가driver로 사용되었다.

결과로 얻은 총 123 개의 subtracted clone을 ABIPRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core kit(Applied Biosystems, Division of perkin-Elmer, Foster city, CA)을 사용하여 시퀀싱을 수행하였다. 시퀀스는 NCBI의 nucleotide BLAST를 통한 GenBank/EMBL/PDB 데이터베이스를 사용하였다.

2) Genomic DNA 준비와 돌연변이 분석

돌연변이 분석을 위하여 각 환자로부터의 genomic DNA는 Wizard genomic preparation kit를 사용하여 백혈구로부터 추출하였으며 (Promega, Madison, WI), 각각의 exon의 PCR 산물을 대상으로 시퀀싱을 수행하였다. GNPTA(MGC4170,MIM#607840)의 genbank No.는 BC071687, NM_02412이며, GNPTAG의 genbank No.는 BC014592, NM_032520이다.

결 과

1.Subtractive hybridization

이전 연구에서, 정상인과 뮤코지방증 환자 사이에 발현양의 차이를 보이는 유전자를 찾기 위한 첫 번째 시도로서 단백질 수준에서의 2- D 전기영동 방법을 사용하였으나 관심 유전자를 찾지 못하였다. 우리는 유전자 수준에서의 선별 방법으로 PCR-based cDNA subtraction 기술을 사용했다. 이 방법은 standard hybridization kinetics을 통한 subtraction으로 인해 서열의 양에 대해 표준화하는 과정이 있기 때문에 다르게

발현하는 cDNA를 1000배 이상의 비율로 얻을 수 있어 매우 유용한 방법이다.

Subtraction cDNA library를 screening하는 데 있어, forward hybridization에서 73개의 클론을 얻었고, reverse hybridization에서는 50개의 클론을 얻었다. 또한 blast search를 수행한 결과, vector contamination을 제외하여 환자의 발현이 감소한 유전자 25개와 발현이 증가한 유전자 16개를 얻을 수 있었다.

뮤코지방증 환자에서 발현이 증가한 유전자는 다음과 같다. Integrin receptor signaling에 관여하여 세포의 이동이나, 분화, apoptosis에 영향을 미치는 HEF1과rheumatoid arthritis의 pathophysiology에서 하위 신호 전달 물질인 Crk-associated lymphocyte type, Cas-L을 관찰할 수 있다. 또한 PKC와 GTPase의 Rho, Arf family에 의해 조절 받는 PLD2와 PAK2 그리고 DNA damage나 apoptosis의 신호 경로에 관여하는 MKP5도 볼 수 있다. Fc-epsilon receptor I beta-chain은 allergic response에 관련된 분자이며, BMCP1은 brain mitochondrial carrier protein1으로서 거의 대부분이 신경 세포에 존재하며 BMCP1은 미토콘드리아의 호흡 효율과 산화제 생성을 변화시키는데, 신경 퇴행성 문제에 있어 뇌의 취약함의 정도를 바꿀 수도 있다. Dystrophin은 그 결함으로 인해 심근증을 일으킬 수 있다는 보고가 있으며, glycolytic pathway와 탄소 대사에서 중요한 효소로 작용하는 pyruvate kinase, pyruvate kinase의 monomer인 thyroid hormone binding protein도 볼 수 있다. 또한 reverse hybridization으로 환자에서 발현이 감소하는 유전자도 탐색하였다. SMAP85는 choriocarcinoma에서는 발현하지 않으나 오직 placental villi에서 발현하는 유전자이

다. 그리고 Chronic progressive external opthamoplegia (CPEO)의 환자에서 관찰되는 미토콘드리아도 검색되었다.

이들 발현양 차이는 앞으로 northern blot이나 RT-PCR 등을 통하여 재차 확인이 필요하며, 탐색한 유전자와 뮤코지방증 사이의 관련성은 앞으로 밝혀내야 할 연구과제이다.

2. Subtracted library 구축을 통한 GlcNAc-phosphotransferase의 α/β subunit 동정

이 중 Clone #7의 435bp 서열은 human MGC4170 유전자의 서열과 일치함을 보였다. MGC4170은 GNPTA와 동일하게 12번 염색체에 위치하며, 21개의 exon을 가지고 있다. 또한 돌연변이 분석을 진행하는 도중 미국 특허청에 등록된 사람의 GNPTA의 서열과 MGC4170의 서열과 일치함을 확인할 수 있었다. 뮤코지방증 환자에서 전사물의 양이 감소하는 이 유전자는 GlcNAc-phosphotrasferase (GNPTA, MGC4170, MIM#607840)임을 알 수 있었다.

3. 돌연변이 분석

MLII와 MLIII에서의 분자 수준에서의 연구를 위해, Canfield, W. M은 GlcNAc-phosphotransferase의 α/β 와 γ subunit를 northern analysis를 통하여 전사물을 측정하였다. MLII의 환자에서는 6.2kb의 α/β 의 전사물이 존재하지 않았고, MLIII에서는 전사물이 감소하나 여전히 존재했다. 이 같은 현상이 gene deletion 때문인가를 조사하였지만 관찰할 수 없었다²³). 그러므로 이 질환의 분자적 결함의 원인은 아마도 전사나 혹은 전사물의 안정에 영향

을 미치는 점 돌연변이나 작은 결손 등이 그 원인이라 예상하였다. 본 연구에서는 subtracted hybridization의 결과, 보고된 바와 동일하게 환자에서 전사물이 적은 GNPTA (MGC4170, MIM#607840)를 관찰할 수 있었고, 뮤코지방증의 주요한 원인으로 보고되는 GNPTA (MGC4170, MIM#607840)와 GNPTAG 유전자를 대상으로 돌연변이 검색을 수행하였다.

GlcNAc-phosphotransferase의 γ subunit의 서열은 알려져 있어, 먼저 3가계의 뮤코지방증 II형과 2가계의 뮤코지방증 III형에 해당하는 환자의 5가계에서 GNPTAG의 돌연변이 검색을 시도해 보았다. 예상과는 달리 GNPTAG에서는 돌연변이를 찾아볼 수 없었기 때문에, GNPTA(MGC4170, MIM# 607840)의 돌연변이 검색을 수행하였다. GNPTAG에 대한 돌연변이는 보고된 바가 있으나, GNPTA (MGC4170, MIM#607840)에 대한 돌연변이 연구는 최초로 시행한 바 다음과 같은 결과를 보였다(Table 3).

뮤코지방증 II형의 환자에서는 Q104X, R1189X, S1058X, H1158fs.X15, W894X의 nonsense mutation과 frameshift mutation의 형태를 보이며, early infancy에 성장 속도 감소를 보인다. 그에 비하여, III형에서는 nonsense mutation과 frameshift mutation과 함께 splicing site mutation이 관찰되어 환자의 돌연변이형과 증상의 심각성은 연관 관계를 보였다.

고찰

I cell disease (MIM 252500, 뮤코지방증 유형 II)와 Pseudo-Hurler polydystrophy (MIM 252600, 뮤코지방증 유형 III)은 간엽 세포에 있는 리소좀 수송이 비정상적으로 이루어져 발생

Table 3. Types of mutations in the GNPTA(MGC4170) gene in 5 families with mucopolipidosis type II or IIIA

Phenotype	Patient	Exon/ Intron	Description	Nucleotide change	Mutation effect
II	1	α/β E3	Q104X	c.310C>T	Nonsense
		α/β E19	R1189X	c.3565C>T	Nonsense
	2	α/β E16	S1058X	c.3173C>G	Nonsense
		α/β E19	H1158fsX15	c.3474_3475delTA	Frameshift
	3	α/β E13	W894X	c.2681G>A	Nonsense
		α/β E19	R1189X	c.3565C>T	Nonsense
III	4	α/β E19	R1189X	c.3565C>T	Nonsense
		α/β I13	IVS13+1G>A	c.2715+1G>A	Splicing
	5	α/β E13	E858fsX3	c.2574_2575delGA	Frameshift

하는 질병이다. 이들 질병의 주요 특징으로는 섬유아세포의 세포질에 생기는 세포 축적물의 증가, 여러 리소좀 효소의 결핍, 뮤코다당류의 부족, 뮤코다당침착증보다 더 빠른 증후를 나타낸다는 것 등을 들 수 있다^{12, 13}.

뮤코지방증 유형 II와 III는 리소좀 질환의 모든 증상 특히 뮤코다당침착증을 포함한다. 뮤코지방증 유형 II는 임상적으로 병세가 매우 격심한 특징을 나타내며 방사선 촬영시 Hurler syndrome과 비슷한 소견을 보인다¹⁴). 보통 유아기 초기에 진단이 가능하고 임상적 증세가 Hurler syndrome과 비슷한 양상을 보인다. 그러나 뮤코다당류의 부족, 심한 정신 지체, 징후가 이르고 진행성이라는 점에서 Hurler syndrome과 구별되는 점이 있다. 골격체 또한 심하게 영향을 받아 연골과 경골이 비정상적이다¹⁵). 생후 1년 동안 발육이 저하되고 생후 2년에는 발육이 거의 멈추게 된다. 심근의 경우 상해가 심하지는 않지만 대개는 심장 판막이 두꺼워지며 5~8세에 사망한다¹⁶). 뮤코지방증 유형 III는 ML II보다 증세가 심하지 않고 2~4세 경에 임상적 징후가

관찰되며 병의 진행 정도가 지연적이라 성인이 될 때까지 생존이 가능하다^{17, 18}). 손과 어깨의 경직, 갈고리 모양의 기형인 손, 작은 신장, 고관절의 파괴 등이 뮤코지방증 유형 III의 두드러진 징후라 할 수 있다. 선행된 연구에 따르면 세가지 유형(IIIa, IIIb, IIIc)의 상보성이 존재한다고 한다¹⁹⁻²¹).

지금까지 뮤코지방증 II의 원인 돌연변이가 두 연구 그룹에 의해 보고된 바 있다. 첫 번째로 보고된 돌연변이는GlcNAc- phosphotransferase의 γ subunit을 코딩하는 GNPTAG 유전자에 존재하는 frame shift mutation (insertion 167)으로 알려져 있다¹¹). 최근에는 14명의 환자로부터 추출한 GNPTAG 유전자 상에 6개의 돌연변이가 새로 발견되었다²²). 이에 근거하여 상보성 유형 IIIc의 분자적 결함이 GlcNAc-phosphotransferase의 γ subunit에 발생한 돌연변이에 기인한다는 가능성을 마련하게 되었다. 이에 관한 문헌의 경우 뮤코지방증 유형 II와 유형 IIIa 돌연변이에 관한 하나의 초록만이 보고되었을 뿐 당시 원인 유전자의 염기서열에 대한

정보는 발표되지 않았다.

GlcNAc-phosphotransferase는 2개의 유전자 산물로서 하나의 유전자는 α 와 β γ subunit을 다른 하나의 유전자는 γ subunit을 코딩한다. GlcNAc-phosphotransferase의 subunit의 염기 서열이 이미 보고되어 있기 때문에, 본 연구에서는 뮤코지방증 유형 II와 유형 III의 소견을 나타내는 5명의 환자 샘플로부터 돌연변이를 동정하는 일에 착수했다.

놀랍게도 GNPTAG 유전자에서는 어떠한 돌연변이도 발견할 수 없었으며, 따라서 본 연구에서 돌연변이가 다른 유전자 상에 존재할 것이라는 가정을 세우게 되었다. GlcNAc-phosphotransferase는 2α , 2β , 2γ subunit으로 이루어져 있으며 염색체 상의 α/β subunit의 위치가 이미 보고되어 있었기 때문에²³⁾, 뮤코지방증 유형 II와 정상인의 섬유아세포로부터 cDNA subtraction library와 proteomic approach를 도입하여 환자의 섬유아세포에서 그 발현이 감소되는 mRNA와 단백질을 동정함으로써 GlcNAc-phosphotransferase의 α/β subunit의 염기서열을 클로닝하고자 하였다. 몇몇 차별적으로 발현되는 cDNA가 클로닝되었고 해당 염기 서열도 분석하였다. 이중에 염색체 위치 12번에 해당하는 단 하나의 염기 서열이 있었다. MGC4170은 21개의 exon으로 이루어져 있는데 Strausberg 그룹에 의해 15,000 cDNA와 함께 발견되었으며 특정 질환과의 연관성이 밝혀진 연구 보고는 없었다. 또한 연구를 진행하는 동안 GlcNAc-phosphotransferase의 α/β subunit의 염기서열이 미국 특허 번호 6.642.038에 의해 실증될 수 있다는 사실도 알게 되었다. 뮤코지방증 유형 II이나 유형 III 질환을 갖고 있는 5명의 환자로부터 GNPTA (MGC4170, MIM#607840) 유전자의 염

기 서열 분석을 수행한 결과 7개의 돌연변이를 확인할 수 있었다.

돌연변이 검색 결과에 의하면 환자의 돌연변이 유형과 임상적 증후의 위중한 정도와의 상관 관계가 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 뮤코지방증 유형 II의 소견을 보이는 3명의 환자들의 경우 Q104X, R1189X, S1058X, W894X, 그리고 H1158fsx15와 같은 돌연변이가 발견되었다. 이러한 환자에서 모든 돌연변이는 nonsense mutation이거나 frame shift mutation으로 확인되었으며, 뮤코지방증 유형 II 환자들은 모두 유아기 초기부터 성장 패턴이 저하되고 승모판과 대동맥 역류 현상이 심한 심장병이 관찰되었다. 3번 환자의 경우 관상동맥 폐쇄증은 관상 동맥 우회 수술을 할 수 밖에 없었다. 물론 유형 II와는 대조적으로 뮤코지방증 유형 III 환자의 경우 nonsense mutation (R1189X)과 frame shift mutation(E858fsX3)외에도 splicing site mutation(Fig. 1)이 발견되었다. 이들 환자들은 성장 패턴이 비교적 정상이었고 승모판 역류 현상이 심하지는 않았다.

돌연변이 종류는 인종에 따라 다를 수 있지만 돌연변이 분석의 실험적 결과와 기존의 참고 문헌에 근거하건대 본 연구를 통하여 뮤코지방증 유형 II와 유형 III의 주요 돌연변이가 GNPTAG 유전자가 아닌 GNPTA (MGC4170, MIM#607840) 유전자 상에 존재한다는 것을 증명할 수 있었다^{11, 22)}. 이러한 결과는 뮤코지방증 질환의 이해에 도움이 될 뿐만 아니라 태아 검진에 대한 정보를 제공하는데 기여할 것이다. 또한 subtracted hybridization을 통하여 발견된 다른 유전자를 통해 뮤코지방증의 원인이나 다른 메커니즘을 규명할 수도 있을 것이며 다른 치료법을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

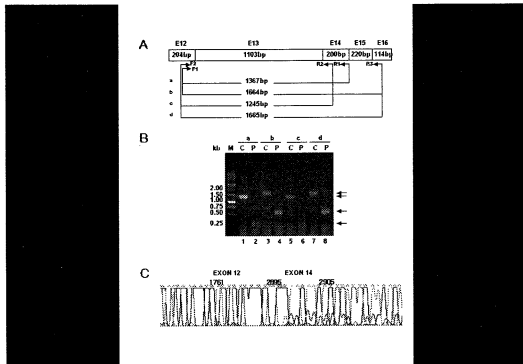


Fig. 1. RT-PCR analysis of total RNA from whole blood samples. (A) Localization of GNPTA cDNA specific primers (F1, F2, R1, R2 and R3) used in the RT-PCR analysis. (B) Electrophoresis of RT-PCR products of GNPTA cDNA. M lane: 1kb DNA marker, Lane C lanes: GNPTA transcript from a control, P lanes: patient (C) Partial sequences of the splicing variant of GNPTA. The sequence represents the part of exon 12, skipped exon 13 and part of exon 14.

요 약

목적: 뮤코지방증 유형 II와 III은 리소좀 효소인 N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase (UDP-N-acetylglucosamine, GlcNAc-phosphotransferase)의 결손에 의해 초래되며, 상염색체 열성으로 유전되는 질환이다. $\alpha/\beta/\gamma$ subunit로 구성되는 이 효소의 결핍으로 인해 리소좀으로 운반되는 수십 종류의 효소들에 mannose-6-phosphate(M6P)를 부착하는 과정에 장애가 생겨 분해되지 않은 물질이 축적되어 질병이 초래된다. 이 질환에 있어서 산전 진단과 유전 상담을 위해서는 상기 효소의 해당

유전자가 밝혀져 있어야 하나, 현재 이 효소의 γ subunit를 암호화하는 유전자가 GNPTAG에 해당된다고 밝혀져 있을 뿐 α/β subunit을 암호화하는 GNPTA에 해당하는 유전자는 밝혀져 있지 않고 돌연변이 역시 보고된 적이 없다. 본 연구는 리소좀 효소의 인산화에 관여하는 N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase의 결함이 있는 환자의 섬유아세포를 이용하여 리소좀 연관 신규 유전자를 찾아내고, 그 유전자를 대상으로 돌연변이를 규명하고자 하였다.

방법: 이를 위해 5명의 환자와 5명의 연령, 성별이 일치하는 정상아의 섬유아세포를 계대 배양하여 이 세포를 이용하여 수행한 subtractive hybridization을 통해 신규 유전자를 탐색하고, 신규 유전자를 대상으로 돌연변이 분석을 수행하였다.

결과: 연구 결과 환자에서 발현이 증가된 유전자 73개와 발현이 감소된 유전자 50개를 밝혀냈다. 분석된 유전자 중에서 MGC4170이 환자에서는 발현되지 않으나 정상인에서는 발현됨을 발견하였고, 이 유전자가 아직 밝혀지지 않은 GNPTA로 확인되어 환자를 대상으로 돌연변이 분석을 시행하였다. 분석 결과 기존에 돌연변이가 보고되었던 GNPTAG에는 돌연변이가 없었으나, MGC4170에는 7개의 돌연변이가 발견되었다. 본 연구는 GlcNAc-phosphotransferase의 α/β subunit에 해당되는 MGC4170의 최초 돌연변이 보고이다.

결론: 본 연구를 통해 뮤코지방증 II형과 III형에서 발현되는 유전자 군을 파악할 수 있었으며, 동시에 MGC4170 돌연변이를 규명함으로써 이 질환의 병리 기전 연구와 산전 진단에 기여하고자 한다.

References

- 1) Lightbody J, Wiesmann U, Hadorn B, Herschkowitz N. I-cell disease: multiple lysosomal-enzyme defect. *Lancet* 1971;1:451.
- 2) Tondeur M, Vamos-Hurwitz E, Mockel-Pohl S, Dereume JP, Cremer N, Loeb H. Clinical, biochemical, and ultrastructural studies in a case of chondrodystrophy presenting the I-cell phenotype in tissue culture. *J Pediatr* 1971;79:366-78.
- 3) Glaser JH, McAlister WH, Sly WS. Genetic heterogeneity in multiple lysosomal hydrolase deficiency. *J Pediatr* 1974;85:192-8.
- 4) Hickman S, Neufeld EF. A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;49:992-9.
- 5) Hickman S, Shapiro LJ, Neufeld EF. A recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;57:55-61.
- 6) Kaplan A, Achord DT, Sly WS. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:2026-30.
- 7) Natowicz MR, Chi MM, Lowry OH, Sly WS. Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of beta-glucuronidase by human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4322-6.
- 8) Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb J* 1987;1:462-8.
- 9) Kornfeld R, Bao M, Brewer K, Noll C, Canfield WM. Purification and multimeric structure of bovine N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *J Biol Chem* 1998;273:23203-10.
- 10) Varki AP, Reitman ML, Kornfeld S. Identification of a variant of mucopolipidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7773-7.
- 11) Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M *et al*. Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC). *J Clin Invest* 2000;105:673-81.
- 12) Kornfeld S SW, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. ed. New York: McGraw-Hill, 2001; Pages.
- 13) Maroteaux P, Lamy M. [Hurler's pseudo-polydystrophy]. *Presse Med* 1966;74:2889-92.
- 14) Leroy JG, Spranger JW. I-cell disease. *N Engl J Med* 1970;283:598-9.
- 15) Patriquin HB, Kaplan P, Kind HP, Giedion A. Neonatal mucopolipidosis II (I-cell disease): clinical and radiologic features in three cases. *AJR Am J Roentgenol* 1977;129:37-43.
- 16) Satoh Y, Sakamoto K, Fujibayashi Y,

- Uchiyama T, Kajiwara N, Hatano M. Cardiac involvement in mucopolipidosis. Importance of non-invasive studies for detection of cardiac abnormalities. *Jpn Heart J* 1983;24:149-59.
- 17) Melhem R, Dorst JP, Scott CI, Jr., McKusick VA. Roentgen findings in mucopolipidosis III (Pseudo-Hurler polydystrophy). *Radiology* 1973;106:153-60.
- 18) Brik R, Mandel H, Aizin A *et al.* Mucopolipidosis III presenting as a rheumatological disorder. *J Rheumatol* 1993;20:133-6.
- 19) Honey NK, Miller AL, Shows TB. The mucopolipidoses: identification by abnormal electrophoretic patterns of lysosomal hydrolases. *Am J Med Genet* 1981;9:239-53.
- 20) Honey NKM, O. T.; Miller, A. L.; Shows, T. B. Genetic heterogeneity within pseudohurler polydystrophy. *Am J Hum Genet* 1981;33:164A.
- 21) Shows TB, Mueller OT, Honey NK, Wright CE, Miller AL. Genetic heterogeneity of I-cell disease is demonstrated by complementation of lysosomal enzyme processing mutants. *Am J Med Genet* 1982;12:343-53.
- 22) Raas-Rothschild A, Bargal R, Goldman O *et al.* Genomic organisation of the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTAG) and its mutations in mucopolipidosis III. *J Med Genet* 2004;41:e52.
- 23) Canfield WMB, M.; Pan, J.; Brewer, A. D. K.; Pan, H.; Roe, B.; Raas-Rothschild, A. Mucopolipidosis II and mucopolipidosis IIIA are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta gene on chromosome 12p. (Abstract). *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63: A15 only.