

한국인 요소 회로 대사 이상 환자의 분자 유전학적 결함에 대한 연구

(Molecular Characterization in Korean Patients with Inborn Error of Urea Cycle)

김구환, 유한옥

울산의대 서울아산병원 의학유전학클리닉

서론

요소 회로 대사 이상(Urea cycle defect)은 출생 직후부터 고암모니아혈증으로 인해 중추신경계의 손상을 일으키는 치명적인 선천성 대사 이상 질환으로, 요소(urea)의 합성에 관여하는 효소 구성원의 결핍이 그 원인이 된다. 외국의 경우 신생아 30,000명당 1명의 빈도로 알려져 있다¹⁾. 요소회로에 관련된 효소는 mitochondrial carbamyl phosphate synthetase (*CPSI*), ornithine transcarbamylase (*OTC*), argininosuccinate synthetase (*ASS*), arginino-lyase (*AL*), arginase (*ARG*), mitochondrial ornithine transporter (*OT*) 이다. 이 6가지 효소 외에 간접적으로 영향을 미치는 효소로, *CPSI*의 활성인자인 N-acetylglutamate를 합성하는 N-acetylglutamate synthetase (*NAGS*)와 citrate-malate transport인 citrin (citrullinemia II; *CTLN2*)이 있다^{1,2)}. 이 중, *OTC* 결핍증이 가

장 흔한 질환 중 하나이고, *ASS* 결핍에 의한 시트룰린혈증, *CPS1* 결핍증이 잦은 빈도로 나타난다. 최근, 시트룰린혈증 2형이 동양인에게서 높은 빈도로 나타난다고 보고되고 있다³⁾. 고암모니아혈증과 함께 *OTC* 결핍증의 경우, 소변으로 orotic acid의 과다 분비 및 혈중 시트룰린 감소의 특징적인 소견을 보이며, *ASS* 결핍은 혈중 시트룰린의 증가를 야기한다. 요소 회로 대사 이상에 관련된 유전자들은 모두 잘 알려져 있다 (Table 1).

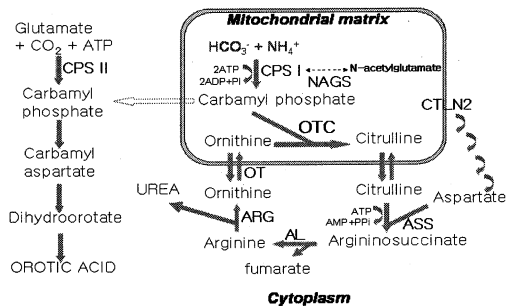


Fig. 1. 요소 회로 대사의 도식.

Table 1. 요소 회로 대사에 관여하는 유전자.

유전자	위치	Genome 크기(kb)	유전양식	exon	Cds(bp)	Amino acids	보고된 돌연변이수 ⁴⁾
<i>OTC</i>	Xp21.1	73	X-linked	10	1,062	354	247
<i>ASS</i>	9q34.1	57	상염색체열성	17	1,239	412	49
<i>CPS1</i>	2q35	123	상염색체열성	40	4,503	1,501	10
<i>ARG</i>	6q23	12	상염색체열성	6	969	323	17
<i>AL</i>	7cen-q11.2	18	상염색체열성	17	1,393	465	32
<i>OT</i>	13q14	23	상염색체열성	8	906	302	16
<i>NAGS</i>	17q21.31	5	상염색체열성	7	1,605	535	9
<i>CTLN2</i>	7q21.3	202	상염색체열성	21	2,028	676	10

본 논문에서는 서울아산병원 의학유전학클리닉으로 의뢰된 요소 회로 대사이상 환자의 유전자형을 분석하여 요소 회로에 관련된 특정 유전자의 결핍여부를 확인하였고, 각각의 유전자에서 나타난 변이의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여 기능 연구를 병행하였다. 또한, 유전자형이 밝혀진 가계에서 산전 검사를 시행하여 태아의 요소 회로 대사 이상의 유무를 확인하였다.

재료 및 방법

1994년부터 2005년까지 서울아산병원 의학유전학클리닉으로 의뢰된 혈연 관계가 없는 요소 회로 대사 이상 환자 38명을 대상으로 *OTC*, *ASS*와 *CPS1* 유전자의 유전자형을 분석하였다. Genomic DNA는 환자의 말초 혈액으로부터 PUREGene kit (Gentra, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 분리하였으며, 각 유전자는 exon-by-exon으로 PCR후, BigDye v.3.0과 ABI3100 Genetic Analyzer (ABI system,

Poster, CA, USA)를 이용하여 염기 서열을 분석하였다. cDNA상에서의 돌연변이 여부 확인을 위하여 환자의 피부 섬유아세포를 배양한 후, RNAzolB (TEL-test, Friendswood, TX, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였고, *CPS1* 결핍증 환자의 경우, 간 조직을 이용하여 RNA를 분리하였다. MMVRT (Promage, Madison, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 염기 서열 분석에 이용하였다. *OTC* 결핍증의 경우, 확인된 변이의 돌연변이 여부를 밝히기 위하여, pcDNA3 (mammalian expression vector; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 site-directed mutagenesis된 human *OTC* cDNA가 삽입된 발현 플라스미드를 COS1 세포에 lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 transfection하였고, 48시간 배양 후, 수집하여 활성도를 HPLC를 이용하여 측정하였다⁵⁾.

산전 검사를 위하여 임신 9-10주에 chorionic villi sample을 채취하여 DNA를 분리하였고, 특정 유전자의 돌연변이만을 선별적으로 검사하였다.

결론

1. OTC 결핍증

혈연 관계가 없는 23가계에서 21개의 서로 다른 돌연변이가 발견되었다. 돌연변이는 p.L9X, p.R26Q, p.R26P, p.T44I, p.R92X, p.G100R, p.R141Q, p.N161S, p.G195R, p.M205T, p.M206R, p.H214Y, p.K221N, p.A237D, p.D249G,

p.R277W, p.F281S, p.R320X, p.V323M, c.853delC와 c.796-805del이다 (Table 2). 이 중 13개의 돌연변이 p.L9X, p.R26P, p.T44I, p.G100R, p.M205T, p.H214Y, p.K221N, p.A237D, p.D249G, p.F281S, p.V323M, c.853del와 c.796-805del이 아직 보고되지 않은 돌연변이였다. 효소의 활성도는 neonatal onset에서는 거의 0%, 그리고 late-onset에서는 약 25-30%의 활성

Table 2. OTC 결핍증 환자의 유전자형

가계	Onset	성별	가족력	유전자형	활성도*	기능적도메인**	구조적도메인***
#1	Neonatal	M	Familial	p.R141Q	R	CPS	-sheet
#2	Late	F	Familial	p.R320X	R	Nonsense	
#3	Neonatal	M	Familial	p.H214Y	0	ONT	-sheet
#4	Neonatal	M	Familial	p.R26Q	R	Leader sequence	
#5	Neonatal	M	Familial	p.R26P	0	Leader sequence	
#6	Neonatal	M	De novo	p.L9X	0	Nonsense	
#7	Neonatal	M	De novo	p.F281S	0	ONT	-sheet
#8	Neonatal	M	De novo	p.D249G	ND	ONT	Joint
#9	Neonatal	M	De novo	p.M205T	ND	ONT	-sheet
#10	Neonatal	M	De novo	c.853delC	ND	Frameshift	
#11	Late	M	De novo	p.V323M	31.6	ONT	-helix
#12	Neonatal	M	Familial	p.R320X	R	Nonsense	
#13	Late	F	De novo	p.G195R	R	ONT	-sheet
#14	Neonatal	M	De novo	p.R92X	R	Nonsense	
#15	Neonatal	M	Familial	p.R141Q	R	CPS	-sheet
#16	Late	M	De novo	p.G100R	25.0	ONT	-helix
#17	Late	M	Familial	p.R277W	R	ONT	-helix
#18	Late	F	De novo	p.T44I	0	CPS	Joint
#19	Neonatal	M	Familial	c.796-805del	0	Frameshift	
#20	Late	F	De novo	p.N161S	0	CPS	-sheet
#21	Late	F	De novo	p.K221N	0	ONT	Joint
#22	Late	F	Familial	p.M206R	R	ONT	-helix
#23	Late	F	De novo	p.A237D	ND	ONT	-helix

*쌍둥이형제

도를 보여 표현형과 유전자형간의 상관관계가 있음을 보였다.

2. 시트룰린혈증

혈연 관계가 없는 13가계 중 14명의 환자에서 5개의 서로 다른 돌연변이가 발견되었다. 돌연변이는 p.G14S, p.R127G, p.G324S, c.420-2 A>G 와 c.1188_1189ins(67bp)이다. 이 중, p.R127G가 보고되지 않은 변이이다. c.420-2 A>G는 mRNA의 splicing 과정에서 이상을 보인 돌연변이로 cDNA 상에서의 염기 서열 분석 결과, exon 6이 결실되어 있음을 보였다(data not shown). c.420-2 A>G 돌연변이가 38.5%로 가장

높은 빈도로 나타나며, p.G324S, c.1188_1189ins(67bp)가 다음으로 높은 빈도를 차지하고 있어, 3가지 돌연변이가 전체의 92.4%를 차지하고 있어 ASS 유전자의 major mutation으로 여겨진다(Table 3).

3. CPS1 결핍증

1명의 CPS1 결핍증 환자에게서 c.1529del과 c.3666+64 T>G 돌연변이를 발견하였다.

c.1529del은 frameshift 돌연변이이고, c.3666+64 T>G는 mRNA의 splicing 과정에서 이상을 보인 돌연변이로 cDNA를 이용한 검사 결과, intron30의 60bp의 염기 서열이 exon30과 31사

Table 3. 시트룰린혈증 환자의 유전자형과 유전자형의 빈도.

가계	Allele 1	Allele 2	돌연변이	빈도	%
#1	p.G324S	p.G324S	c.420-2 A>G p.G324S c.1188_1189ins p.G14S p.R127G	10/26	38.6
#2	c.420-2 A>G	c.420-2 A>G		8/26	30.8
#3	p.G324S	p.G324S		7/26	27.0
#4	c.420-2 A>G	p.G324S		1/26	3.8
#5	c.420-2 A>G	p.G324S		1/26	3.8
#6	p.R127G	c.1188_1189ins			
#6-1*	p.R127G	c.1188_1189ins			
#7	c.1188_1189ins	c.1188_1189ins			
#8	c.420-2 A>G	c.1188_1189ins			
#9	p.G14S	c.1188_1189ins			
#10	c.420-2 A>G	p.G324S			
#11	c.420-2 A>G	p.G324S			
#12	c.420-2 A>G	c.1188_1189ins			
#13	c.420-2 A>G	p.G324S			

* R:reported; ND:Not done ** ONT:ornithine binding domain; CPS:carbamoyl phosphate binding domain *** Joint: -helix와 -sheet의 연결부위

이에 삽입되어 나타났다 (data not shown).

4. 산전진단

혈연 관계가 없는 10가계에서 총 20번의 산전진단을 시행하였다. OTC 결핍증이 6 가계에서 10번, 시트룰린혈증이 3가계에서 9번, 그리고 CPS1 결핍증에서 1번 시행하였다. 이 중, OTC 결핍증은 2명의 태아가 환자, 1명의 태아가 보인자로 판명되었다. 시트룰린혈증의 경우, 4명의 태아가 환자, 5명의 태아가 보인자였고, CPS1 결핍증은 1명의 태아가 보인자였다.

고 찰

요소 회로 대사 이상은 신생아 30,000명당 1명의 빈도로 알려진 비교적 흔한 대사 질환은 아니지만, 출생 직후, 고암모니아혈증과 함께 구토, 빈호흡, 의식 변화를 일으키며 혼수, 사망으로 이르기거나, 중추 신경계의 손상을 야기하는 치명적인 질환이다. 요소 회로 대사 이상과 관련된 효소군 중에서 ornithine transcarbamylase, argininosuccinyl synthetase, carbamyl-phosphate synthetase의 결핍이 높은 빈도로 나타나고 있다. 본 논문에서는 혈연관계가 없는 38명의 요소 회로 대사 이상 환자를 대상으로 위 3가지 유전자의 돌연변이 여부를 확인하고, 그 돌연변이의 효소의 기능적 결손을 증명하고자 하였다.

요소 회로 대사에 관여하는 유전자 산물은 대부분 간에서 특이적으로 발현하므로 환자의 요소 회로 대사 관련 유전자 산물에 대한 활성도 측정을 위해서는 간 조직의 생검이 필요하다. 본 논문에서는 돌연변이형에 따른 활성도를 *in*

*vitro*상에서 측정함으로써 간 조직의 생검 없이 특정 산물의 활성도의 결손 여부를 확인할 수 있는 시스템을 소개하였다. 여기서는 OTC 활성도 측정에서만 시도하였으나, HPLC를 이용한 활성도 측정법⁵⁾은 ASS나 CPS1에서도 응용할 수 있을 것이라 예상된다.

또한, 효소 활성도의 직접적인 측정 없이 인터넷상의 데이터베이스를 활용함으로써 효소의 기능적인 결손 여부를 유추할 수도 있었다. OTC의 경우, 구조적인 domain이 *-helix*와 *-sheet*, 그리고 두 구조를 연결하는 joint로 나누어질 수 있으며, *-helix*는 효소의 구조적 지지에 관여하고, *-sheet*는 활성부위를 포함하는 구조로 알려져 있다. 남자 late-onset에서의 경우, p.G100R, p.R277W, 와 p.V323M은 모두 *-helix*에 위치하고 있고, neonatal-onset인 돌연변이는 *-sheet*에서 주로 발견되었다. 구조적인 지지를 하는 *-helix*는 비교적 효소의 활성에 영향을 덜 미친다고 생각할 수 있다. 시트룰린혈증에서 보고되지 않은 돌연변이 p.R127G는 기능적인 유추를 할 수는 없었으나, 중간 동일성 비교를 통하여 진화적으로 보존된 정도를 조사해 본 결과, 상당히 잘 보존된 부위였다. 이는 효소 활성에서 중요한 역할을 하는 부위임을 암시하는 것으로 이 부위의 변이는 효소 활성에 영향을 미치는 돌연변이일 가능성이 상당히 높음을 시사한다. CPS1 결핍증 환자에게서 보인 돌연변이는 frameshift를 야기하는 결실 돌연변이와 60bp의 in-frame insertion으로 20개의 아미노산이 CPS1 효소 중간에 위치하게 되어 활성도에 영향을 미칠 것으로 예상된다.

최근 요소 회로 대사 이상의 하나로 citrin 결핍증(CTLN2; *SLC25A13*)이 보고되고 있는데, 중국, 일본 및 한국인 정상군에서 비교적 높은

빈도로 나타난다고 한다⁴⁾. 본 논문에서 언급되지 않은 몇 명의 환자를 대상으로 CTLN2 유전자의 결실 여부를 확인한 결과, 일본인에게서 보고된 돌연변이와 유사한 양상을 보였다 (data not shown). 요소 회로 대사 이상 환자의 빈도는 높지 않으나, citrin 결핍증을 포함한 요소 회로 대사 이상의 보인자 빈도는 비교적 높을 것으로 예상된다. 수유 후부터 발병되는 특성상, 신생아의 생화학적 선별 검사법으로는 검출이 안될 가능성이 높아 유전자형을 이용한 선별 검사법이 응용되어야 할 것이다. OTC는 전체 유전자에 걸쳐서 고루 나타나는 양상을 보여 특정 hot spot이 없으며, CPS1, NAGS, AL, AGR, OT 등은 빈도가 낮아 hot spot을 찾을 수가 없다. 그러나, ASS나 CTLN2의 경우, 환자군에서 높은 빈도로 나타나는 major mutation이 있어 신생아 선별검사에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

일단 유전자형이 한 가계에서 밝혀지면, 다른 가계 구성원에서의 유전자형을 쉽게 규명할 수 있고, 산전에 태아의 질환 유무를 판별할 수 있어 선별적인 출산이 가능하게 된다. 더 나아가 착상전 진단 (PGD; Preimplantation Genetic Diagnosis)을 통해 임신 전에 건강한 태아의 선별이 가능하도록 하는 기초 자료로 이용될 수 있다.

본 논문에서는 한국인 요소 회로 대사 이상 환자에서의 유전자형을 규명하고, 효소 활성도와 의 상관관계를 위한 *in vitro* 효소 활성도 측정 시스템과, 규명된 유전자형을 이용한 산전 진단의 예를 보고하였다. 더 나아가 정상군에서의 보인자 선별법을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

References

- 1) Gordon N. Ornithine transcarbamylase deficiency: a urea cycle defect. Eur J of Paediatr Neurol 2003;7:115-21.
- 2) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee, JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. Nature Genet 1999;22:159-63.
- 3) Naoki Y, Keiko K, Tomotsugu Y, Ikumi N, Mikio I, Masanori N, Mitsuhiro O, Ikuko K, Takeyori S. Screening of SLC25A13 Mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis methods for nine mutations Hum Mutat 2002;19:122-30.
- 4) Stenson PD, Ball EV, Mort M, Philips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. Hum Mutat 2003;21:577-81.
- 5) Carunchio V, Girelli AM, Messina A. Buffer effect on the kinetics of ornithine carbamyltransferase by HPLC. Biomed chromatogr 1999;13:65-9. der sequence