

## 한국인에서의 페닐케톤뇨증의 유전자변이에 대한 고찰

<sup>1</sup>순천향대학교 의과대학 소아과학교실, <sup>2</sup>순천향대학교 부천병원 진단검사의학과  
<sup>3</sup>이화여자대학교 의과대학 생화학교실, <sup>4</sup>성균관대학교 의과대학 진단검사의학교실

유수정<sup>1</sup> · 홍용희<sup>1</sup> · 이용화<sup>2</sup> · 정성철<sup>3</sup> · 기창석<sup>4</sup> · 이동환<sup>1</sup>

### The Study of DNA Mutations of Phenylketonuria in Koreans

Su Jung Yoo<sup>1</sup>, Yong Hee Hong<sup>1</sup>, Yong Wha Lee<sup>2</sup>  
Sung Chul Jung<sup>3</sup>, Chang Seok Ki<sup>4</sup> and Dong Hwan Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, College of Medicine, Soonchunhyang University, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine and Genetics, Soonchunhyang University Bucheon Hospital and  
College of Medicine, Soonchunhyang University, Bucheon, Korea

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha University, Seoul, Korea

<sup>4</sup>Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center  
College of Medicine, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

**Purpose :** Phenylketonuria(PKU) is an inborn error of metabolism and a genetic disorder resulting from a deficiency of phenylalanine hydroxylase(PAH) and decreased activity of tetrahydrobiopterin(BH<sub>4</sub>). In this study the correlation between the DNA mutation and clinical manifestations was investigated and PAH DNA mutations were compared between Asian and Caucasian populations.

**Methods :** DNA was isolated from peripheral leukocytes. The PAH gene was amplified by Polymerase Chain Reaction(PCR) and the sequence was analyzed with Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification(MLPA).

**Results :** We characterized the PAH gene of 102 independent Korean patients with PKU. PAH nucleotide sequence analysis revealed 44 different mutations, including 10 novel mutations comprising 9 missense mutations(N207D, K95del, A447P, G344D, P69S, S391I, A202T, G103S, and I306L) and 1 novel splice-site variant mutation(IVS10-3C>G). R243Q was the most prevalent mutation in this study. A259T has not previously been reported in Asian populations, but we found that this mutation had a frequency of 10.1% in our study. Furthermore, the genotypes of BH<sub>4</sub> responsive patients were analyzed and were divided into two groups: BH<sub>4</sub> medication-only group and BH<sub>4</sub> medication with diet therapy group. In the BH<sub>4</sub> medication-only group and BH<sub>4</sub> medication with diet therapy group, R241C was the most common mutation.

**Conclusion :** Novel mutations in the PAH gene of PKU patients are still being discovered. Additional information as to the frequency of mutations in the tetrahydrobiopterin responsive gene is also accumulating. We anticipate that knowledge of these PKU gene mutations will assist the diagnosis, genetic counseling, and therapeutic treatment of PKU patients in future.

**Key Words :** Phenylalanine hydroxylase, Phenylketonuria, Mutation, Tetrahydrobiopterin responsive PKU

책임저자 : 이동환, 서울특별시 용산구 한남동 대사관길 22  
순천향대학교 의과대학 소아과학교실  
Tel : 02)709-9341, Fax : 02)794-5471  
E-mail : ldh@hosp.sch.ac.kr

### 서 론

페닐케톤뇨증(Phenylketonuria, PKU)은 상염색체 열성으

로 유전되는 유전성 대사질환으로 간에서 페닐알라닌을 타이로신으로 전환시키는 페닐알라닌 수산화효소(phenylalanine hydroxylase, PAH)의 완전 혹은 부분적인 결핍으로 인하여 요중에 다량의 페닐케톤체를 배설하게 된다<sup>1,2)</sup>. 페닐케톤뇨증은 PAH 유전자 돌연변이에 의해 발생하는데 PAH 유전자는 12번 염색체 장완에 위치하고 있으며 염색체의 90 kb 정도를 차지하고 있다. PAH는 테트라하이드로바이오프테린(tetrahydrobiopterin, BH<sub>4</sub>)을 조효소로 사용한다. 이는 3가지 구조적 도메인으로 촉매성 영역(catalytic domain)인 N-terminal regulatory domain과 C-terminal tetramerization domain으로 구성되어 있다<sup>3)</sup>. 활동성 PAH 효소는 4개의 단량자 표현형(monomeric) 단백질로 구성되어 있다. 최근에 PAH 결정(crystal) 구조에 대한 연구에서는 보조인자와 기질의 활동성 부위와 결합부위에 대한 정보를 제공하고 있다.

PAH 유전자는 약 500개 이상의 다른 돌연변이들이 밝혀져서 PAH Mutation Analysis Consortium Database(PAHdb)에 저장되어 있다. 질병의 정도도 양성 고페닐알라닌혈증(mild hyperphenylalaninemia, MHP)에서 식약요법으로 조절되는 전형적 페닐케톤뇨증(classic PKU)까지 다양하다.

또 다른 표현형(phenotype)은 BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증이다. BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증 환자들의 혈중 페닐알라닌 농도는 식사제한을 하지 않고 BH<sub>4</sub>의 경구투여로 조절이 된다. 몇몇 연구들은 유전자형과 다양한 표현형과의 연관성을 밝혀려 하였다. 이렇게 유전자형과 표현형의 연관성이 밝혀지면 식약요법을 계획하거나 치료 방법을 모색하는데 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

본 연구는 순천향대학교병원 소아청소년과에서 진단받은 143명의 페닐케톤뇨증 환자들의 PAH 유전자를 분석하여 유전자형과 표현형의 연관성을 연구함으로써 유전 상담 및 치료 방향을 제시하는데 도움이 되고자 하였으며 더 나아가 한국인에서 PAH 유전자 돌연변이의 다양성을 분석하여 일본과 중국 등의 다른 동양 국가들과 비교분석하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1983년 1월부터 2007년 4월까지 만 22년 9개월 동안 순천향대학교병원에서 신생아 선별검사와 생화학적 방법으로 PAH 결핍이 확인되어 진단된 143명의 페닐케톤뇨증 환자를

대상으로 하였고, 연령은 생후 3일에서 14세였다. PAH 유전자 검사는 102명에서 시행하였다. 환자의 정도는 페닐알라닌 제한 식사를 한 후 혈중 페닐알라닌을 측정하여 BH<sub>4</sub> 비반응형 전형적 페닐케톤뇨증, BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증 그리고 양성 고페닐알라닌혈증으로 분류하였다.

## 2. 방법

### 1) BH<sub>4</sub> 부하검사(BH<sub>4</sub> loading test)

BH<sub>4</sub> 부하검사는 BH<sub>4</sub> 20 mg/kg(36개월 미만의 환아) 또는 7.5 mg/kg(36개월 이상의 환아)를 경구 투여하여 시행하였다. 혈중 페닐알라닌 농도는 경구 BH<sub>4</sub> 복용 전, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 후에 각각 측정하였다. 첫 혈중 페닐알라닌 농도가 BH<sub>4</sub> 투여 후 최소 30% 이상 감소하면 BH<sub>4</sub> 반응형이라고 정의하였다.

### 2) DNA 분석

보호자의 동의를 얻은 후 환자와 환자 가족들의 혈액을 채취하였다. DNA 계놈은 Wizard Genomic DNA Purification kit(Promega, Madison, WI)를 사용하여 말초혈액의 백혈구에서 얻었고 모든 13개의 PAH exons와 intron sequence는 증합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 사용하여 증폭시켰다. 5개의 증폭된 산물은 10U shrimp alkaline phosphatase와 2U exonuclease I로 처리하였고 그 후 ABI Prism 3100 genetic analyzer(Applied Biosystems)의 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit(Applied Biosystems)를 사용하여 direct sequencing을 시행하였다. 새로운 돌연변이 가능성이 있는 변이들은 PAHdb database(<http://www.pahdb.mcgill.ca>)와 이전에 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)에 보고된 바 없었던 돌연변이들로 정의하였다.

### 3) MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 분석

PKU 환자 중 이전 서열 분석에서 하나 또는 두 개의 대립 유전자에서 PAH 유전자 돌연변이가 발견되지 않은 경우 MLPA를 시행하였다. SALSA P055 PAH MLPA kit(MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands)는 25개의 probe set로 구성되어 있으며 13개는 PAH에 특이적이고 나머지 12개는 다른 인간 유전자에서부터 얻은 control standard probe를

포함하고 있다. 분석은 200  $\mu\text{L}$  tube를 thermal cycler(Model 9700; Applied Biosystems)에 넣어 시행하였다. 각 대상으로 부터 얻은 총 200 ng의 DNA 게놈을 Tris EDTA buffer 5  $\mu\text{L}$  에 희석하여 98°C에서 5분간 변성시켰다. 그 후 1.5  $\mu\text{L}$ 의 MLPA buffer와 1.5  $\mu\text{L}$ 의 probe mix를 부가하였고 target DNA를 1분 동안 95°C에서 가열한 후 16시간 동안 60°C에서 서서히 식혔다. Ligase-65 mix 32  $\mu\text{L}$ 를 각 sample에 첨가하였고 서서히 식혀진 표식자들을 54°C에서 15분간 결합하였으며 그 후 98°C에서 5분 동안 불활성화시켰다. 10  $\mu\text{L}$ 의 ligation reaction은 6-FAM fluorescent dye로 표지된 한 쌍의 공통 표식자를 사용한 multiplex amplification을 위해 제거하였다. 60°C에서 Taq polymerase 총 50  $\mu\text{L}$ 를 PCR에 추가하였고 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 동안 총 36 cycles을 진행하였고, 마지막 extension step으로 72°C에서 20분간 수행하였다. 0.5  $\mu\text{L}$ 와 0.75  $\mu\text{L}$  사이의 반응을 각각 TAMRA-

labeled internal size standard 0.5  $\mu\text{L}$ 와 deionized formamide 12  $\mu\text{L}$ 에 혼합하였고 ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)로 fragment analysis를 하였다. Fragment analysis에 사용한 조건은 다음과 같다; 36cm capillary의 polymer POP-4; 60°C의 run temperature; injection voltage, 15 kV; injection time, 3-5초; run voltage, 15 kV; run time, 24분. 결과는 Genescan 3.1.2 software를 사용하여 분석하였다. Peak heights는 정상화시켰고 peak height가 control peak height의 65% 미만일 경우 exon deletion이라고 판단하였다.

**결 과**

본 연구에 참여한 페닐케톤뇨증 환자의 수는 총 143명이며 이 중 102명의 환자들의 유전자 검사를 시행하였다(Table 1). BH<sub>4</sub> 비반응형 전형적 페닐케톤뇨증 환아는 전체 143명중 118명으로 이중 82명이 유전자 검사를 시행하였고 BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증은 20명의 환아 중 15명, 양성 고페닐알라닌혈 증은 5명의 환아 중 5명 모두가 유전자 검사를 시행하였다. 본 연구에서는 총 44가지의 돌연변이가 발견되었고 이들 중 10개의 novel mutation이 발견되었다. 10개의 새롭게 발견된 novel mutation은 N207D, K95del, A447P, G344D, P69S, S391I, A202T, G103S, I306L, 그리고 novel splice-site mutation인 IVS10<sup>-3</sup>C>G이다(Table 2).

Intervening sequence 내의 돌연변이가 있는 IVS10<sup>-3</sup>C>G

**Table 1.** Classification of Phenylketonuria

	PKU patients (N=143)	PKU patients with gene study (N=102)
BH <sub>4</sub> nonresponseive classic PKU	118	82
BH <sub>4</sub> responseive classic PKU	20	15
Benign HPA	5	5

HPA, Hyperphenylalaninemia; PKU, Phenylketonuria; BH<sub>4</sub>, Tetrahydrobiopterine  
N, number

**Table 2.** The Spectrum of 199 Phenylalanine Hydroxylase Mutation Alleles Detected in 102 Phenylketonuria Patients

Genotype	Alleles		Genotype	Allele		Genotype	Alleles	
	N	%		N	%		N	%
R243Q	26	13.1	R243G	2	1.0	P69S	1	0.5
IVS4 <sup>-1</sup> G>A	23	11.6	K95del	2	1.0	P281A	1	0.5
Y204C	21	10.6	IVS10 <sup>-3</sup> C>G	2	1.0	N207D	1	0.5
A259T	20	10.1	IVS10 <sup>-3</sup> C>T	2	1.0	L48S	1	0.5
R241C	15	7.5	I65T	2	1.0	L255S	1	0.5
Y356X	14	7.0	A447P	2	1.0	IVS19 <sup>-14</sup> C>G	1	0.5
V388M	9	4.5	A345T	2	1.0	IVS10 <sup>-14</sup> C>G	1	0.5
Y325X	6	3.0	G344D	2	1.0	I306L	1	0.5
R413P	6	3.0	A202T	1	0.5	S391I	1	0.5
T278I	5	2.5	T281I	1	0.5	G332Q	1	0.5
S70del	4	2.0	T266R	1	0.5	G247R	1	0.5
R111X	4	2.0	R408Q	1	0.5	G239S	1	0.5
P281L	4	2.0	R261X	1	0.5	G103S	1	0.5
R176X	3	1.5	R261Q	1	0.5	D84Y	1	0.5
R53H	2	1.0	R158Q	1	0.5			

N, number

**Table 3.** The Spectrum of 161 Phenylalanine Hydroxylase Mutation Alleles Detected in 82 Tetrahydrobiopterine Nonresponsive Classic Phenylketonuria Patients

Genotype	Alleles		Genotype	Alleles		Genotype	Alleles	
	N	%		N	%		N	%
R243Q	23	14.2	R243G	2	1.2	K95del	1	0.6
IVS4 <sup>-1</sup> G>A	23	14.2	I65T	2	1.2	G239S	1	0.6
Y204C	20	12.4	IVS10 <sup>-3</sup> C>G	2	1.2	R408Q	1	0.6
A259T	16	9.9	T281I	2	1.2	R53H	1	0.6
Y356X	14	8.6	R241C	1	0.6	N207D	1	0.6
R413P	6	3.7	R111X	1	0.6	IVS19 <sup>-14</sup> C>G	1	0.6
Y325X	5	3.1	G332Q	1	0.6	G103S	1	0.6
V388M	4	2.5	IVS10 <sup>-14</sup> C>G	1	0.6	A202T	1	0.6
T278I	4	2.5	P69S	1	0.6	T266R	1	0.6
P281L	4	2.5	A447P	1	0.6	W187X	1	0.6
S70del	3	1.8	L48S	1	0.6	R158Q	1	0.6
R176X	3	1.8	I306L	1	0.6	P281A	1	0.6
A345T	2	1.2	S391I	1	0.6	D84Y	1	0.6
IVS10 <sup>-3</sup> C>T	2	1.2	R261X	1	0.6	R261Q	1	0.6

N, number

의 novel splice site variant도 새롭게 발견된 돌연변이로 이런 splice accepting 부위의 -3 sequence는 엄격히 보존되는 sequence이며 이 때문에 이렇게 다른 것으로 치환이 되는 경우 비정상 변종의 접합산물(splicing products)을 초래하게 된다<sup>5)</sup>. 본 연구에서는 novel frameshift mutation이나 non-sense mutation은 발견되지 않았다.

R243Q와 IVS4<sup>-1</sup>G>A가 한국인 페닐케톤노증 환자들에서 가장 흔한 돌연변이로 나타났다. 243번째 arginine이 glutamic acid로 바뀐 R243Q가 26개의 독립 대립유전자수로 13.1%를 차지하였으며 그 다음으로 intron 내의 intervening sequence에 돌연변이가 발생한 경우로 IVS4<sup>-1</sup>G>A같은 split site 변이가 23개로 11.6%를 차지하였고 204번째 tyrosine이 cysteine으로 바뀐 Y204C가 21개로 10.6%에서 확인되었다. 이 돌연변이들은 한국에서만 아니라 동양 국가들에서 비교적 흔한 돌연변이로 밝혀졌다(Table 7)<sup>25)</sup>.

### 1. 전형적 페닐케톤노증

전형적 페닐케톤노증 환자 전체의 유전자형으로는 총 42가지의 유전자형이 밝혀졌으며 총 161개의 대립유전자 중에 R243Q와 splice site mutation인 IVS4<sup>-1</sup>G>A가 161개 중 46개의 대립유전자 수로 가장 많은 28.4%를 차지하였다(Table 3).

### 2. BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤노증

본 연구에서 15명의 BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤노증 환자들에서

**Table 4.** The Spectrum of 30 Phenylalanine Hydroxylase Mutation Alleles Detected in 15 Tetrahydrobiopterine Responsive Classic Phenylketonuria Patients

Genotype	Alleles (N=30)	%
R241C	10	33.3
A259T	4	13.3
V388M	4	13.3
R243Q	3	10.0
R111X	3	10.0
G344D	2	6.7
T278I	1	3.3
G247R	1	3.3
K95del	1	3.3
A447P	1	3.3

N, number

총 30개의 대립유전자 수를 보였으며 그 중 R241C가 33.3%를 보였고, 그 다음으로 A259T, V388M 등의 순으로 나타났다(Table 4). BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤노증의 경우를 두 가지 또 다른 군으로 나누어 보았다: 약으로만 치료되는 경우와 약과 식사요법을 병행하여야만 조절이 되는 경우를 비교하였다. 약으로만 또는 약과 식사요법을 병행하여야만 조절되는 경우 모두 R241C가 가장 많았으며 그 외 공통적으로는 A259T, R243Q, G344D, R111X 등이 있었다. T278I과 V388M 같은 경우는 약으로만 치료되던 군에서만 나타났으며 이 두 mutation은 예후가 좋을 것으로 추정할 수 있고 K95del과 A447P

등의 경우는 식사요법을 병행하는 환아들에서만 발견되는 것으로 미루어 보아 이들의 경우에는 예후가 안 좋을 수 있을 것으로 추정할 수 있다(Table 5).

### 3. 양성 고페닐알라닌혈증

5명의 고페닐알라닌혈증 환아가 확인되었고 가장 빈도 높은 유전자형은 R241C로 10개의 대립유전자 중 4개의 대립유

**Table 5.** Comparison of Genotypes of 15 Tetrahydrobiopterine Responsive Classic Phenylketonuria Patients Between Only Medication Group and Medication with Diet Therapy Group

Genotype	Alleles (N=30)	Only Medication (N=16)		Medication+Diet (N=14)	
		N	%	N	%
R241C	10	7	70	3	30
A259T	4	2	50	2	50
V388M	4	2	50	2	50
R243Q	3	1	33	2	66
R111X	3	1	33	2	66
T278I	1	1	100	0	0
G247R	1	1	100	0	0
G344D	2	1	50	1	50
K95del	1	0	0	1	100
A447P	1	0	0	1	100

N, number

**Table 6.** The Spectrum of 10 Phenylalanine Hydroxylase Mutation Alleles Detected in 5 Benign Hyperphenylalaninemia Patients

Genotype	Alleles (N=10)	%
R241C	4	40
S70del	1	10
R53H	1	10
Y204C	1	10
L255S	1	10
V388M	1	10
Y325X	1	10

N, number

전자 수로 40%를 차지하였다(Table 6).

### 4. 국가 간 고페닐알라닌혈증의 유전자형의 비교

한국과 중국의 경우 R243Q가 가장 흔한 대립유전자다. 일본은 R413P가 그리고 대만은 R241C가 가장 흔한 빈도로 나타났다. 또 유럽국가들은 IVS12<sup>-1</sup>G>A가 가장 흔한 유전자형으로 우리나라를 비롯한 동양 국가들과의 차이를 보이고 있다(Table 7)<sup>25)</sup>.

### 5. MLPA

염기서열 분석을 시행한 결과 편측 또는 양측 대립유전자에서 PAH 유전자의 변이가 확인되지 않았던 8명의 환자에 대해 MLPA 분석이 시행되었다. 이 중 6명에서 결실 또는 중복이 확인되었는데 5명에서는 엑손 결실이 관찰되었고 한 명에서는 4번 엑손의 중복이 관찰되었다. 엑손 결실이 있었던 5명 중 4명은 5번과 6번 엑손 전체에 대한 동일한 양상의 결실을 보인 반면 한 명에서는 4번부터 7번까지의 엑손의 결실을 보였다. 그러나 나머지 2명에서는 MLPA 상에서 결실이나 중복이 관찰되지 않았다. 전체 33명의 페닐케톤뇨증 환자 중 6명에서 엑손의 결실이나 중복이 관찰되어 발생 빈도는 약 9%(6/ 66)이었다.

### 고 찰

페닐케톤뇨증은 1934년 정신박약아의 소변을 검사하던 중 FeCl<sub>3</sub>와 반응하여 녹색으로 변하는 물질이 있음을 발견하면서 처음 기술된 아미노산 대사의 이상으로 생기는 유전성 질환이다<sup>1, 2)</sup>. 분자생물학의 기술적 발전에 의해 인간의 PAH 유전자의 locus가 염색체 12번의 q22-q24.1에 위치하고 있음이 이미 오래전 밝혀진바 있고, 페닐케톤뇨증은 이 PAH 유전자의 돌연변이에 의해 발생하는 상염색체 질환인 것으로 밝혀졌다<sup>3, 4)</sup>. 페닐케톤뇨증은 대부분 PAH의 결핍으로 발생하는 전형적인 페닐케톤뇨증에 속하지만 이 과정에서 조효소로 작

**Table 7.** Relative Frequencies of Common Phenylalaninemia Hydroxylase Mutation Found in Asia and Europe<sup>25)</sup>

Korea		Japan		China		Taiwan		Europe	
Mutation	Frequency	Mutation	Frequency	Mutation	Frequency	Mutation	Frequency	Mutation	Frequency
R243Q	13.8%	R413P	30.5%	R243Q	18.3%	R241C	32.0%	IVS12 <sup>-1</sup> G>A	38.0%
IVS4 <sup>-1</sup> G>A	11.2%	R243Q	7.3%	E6-96A>G	11.5%	R408Q	14.0%	A408T	20.0%
R241C	6.1%	IVS4 <sup>-1</sup> G>A	7.3%	R111X	10.7%	R243Q	6.0%	A261G	18.0%
A259T	5.6%	T278I	7.3%	R413P	8.7%	R111X	4.0%	A158G	14.0%

용하는 BH<sub>4</sub>의 결핍으로도 발생할 수 있는데 이런 경우 악성 페닐케톤뇨증이라 하기도 한다.

Waisbren 등<sup>5)</sup>은 페닐케톤뇨증에 대한 systemic review와 meta-analysis에서 반 이상의 환자들은 임상적으로 비교적 경한 표현형을 지니고 있고 전 세계적으로 페닐케톤뇨증의 발생 빈도는 매우 다양하며 인종간의 차이를 보이고 있다고 보고하였다. 아일랜드에서는 약 1:4,500<sup>6)</sup>으로 가장 높은 빈도를 나타내고 있다. 동유럽의 국가들은 Estonia가 1:6,000<sup>7)</sup>, 헝가리가 1:9,000<sup>8,9)</sup>, 라트비아공화국은 1:8,700<sup>10)</sup>의 빈도를 보이고 있다. 핀란드, 일본, 태국이 각각 1:100,000<sup>11)</sup>, 1:108,000<sup>12)</sup>, 1:212,000<sup>13)</sup>의 빈도로 비교적 낮은 빈도를 나타내고 있다. 그리고 한국인에서는 1988년 신생아 선별검사가 시행되면서부터 현재까지 약 1:44,000의 빈도를 나타내고 있다.

1986년부터 본격적으로 PAH 유전자의 identification이 시작되면서 현재까지 500여 가지의 다른 돌연변이들이 PAH mutation database(PAHdb:http://www.mcgil.ca/pahdb)에 등록되기 시작하였다<sup>14)</sup>. 최근까지 PAH 유전자의 돌연변이에 대한 연구가 활발히 진행되면서 페닐케톤뇨증 환자의 유전자형과 표현형의 연관성이 향후 치료와 예후에 매우 중요한 역할을 할 것임이 밝혀지면서 다양한 DNA 분석 방법들이 밝혀지고 있다<sup>15)</sup>. 과거부터 많은 연구들이 다양한 인종의 유전자 분석을 시행하고자 하였고 이러한 검사들에 의해 약 90-99%의 PAH 유전자의 돌연변이 검출 비율을 나타내었다<sup>14, 16, 17)</sup>. 본 연구에서도 97%의 돌연변이 검출 비율을 보였다. 이렇게 유전자 분석이 사용되면서부터 특별한 방법들이 개발되고 도입되고 있다. 초기에는 large deletion/duplication을 발견하는데 Southern blotting이 사용되었으나 비용과 시간이 너무 많이 소비되었고 많은 양의 DNA를 필요로 해서, 그 후에는 long-range PCR을 사용하였으나 20 kb 이상의 크기의 유전자를 연구할 때에는 중복된 증폭산물(overlapping amplicon)이 생겨서 추가적인 분석이 뒤따랐고 민감도도 떨어진다는 단점이 있었다<sup>18)</sup>. 그러므로 만족할만한 결과를 얻으려면 많은 수의 다른 증폭산물을 연구할 수 있어야 했기에 real time fluorescent PCR과 comparative multiplex dosage analysis가 발달하게 되었다<sup>18)</sup>. 그리고 가장 최근에는 genomic rearrangement를 접근하는데 본 연구에서 사용된 MLPA이 개발되어 많은 연구에 도입되었다. MLPA는 large gene deletions/duplications에 의해 발생하는 유전 질환들의 진단, 특히 PAH 유전자에 신뢰할 수 있는 진단적 수단으로 급부상하였다<sup>18-20)</sup>.

서로 다른 인종 사이에는 각 인종만의 특유의 다른 PAH

유전자 돌연변이 allele series가 있고 하나 또는 몇 가지의 우세한 founder 대립유전자를 포함하고 있다는 사실은 잘 알려진 바이다<sup>16)</sup>. 각 인종들의 PAH 유전자 돌연변이의 자료를 비교해 보았을 때, 연구대상인 인종의 돌연변이와 유전적 과거력(genetic history) 사이에는 연관성이 있어 보였다. 예를 들어, 유럽에는 R408W, IVS12<sup>-1</sup>G>A, IVS10<sup>-1</sup>G>A, 그리고 Y414C와 같이 특정 우세한 founder 대립유전자가 존재하며 이들은 유럽인구의 확장, 이주 그리고 유전학적 drift 흐름을 나타내고 있다<sup>16)</sup>. 동유럽과 독일에 있는 20-84%의 페닐케톤뇨증 환자들은 R408W 돌연변이를 나타내고 있었다. 그러나 이런 돌연변이들은 동양인 사이에서는 아주 드물게 발견되고 있다. 이전 연구에서 1992년에 Okano 등<sup>21)</sup>은 일본, 한국, 중국 환자들의 PAH 유전자 돌연변이의 빈도와 분포를 보고한 바 있으며 이때 R241C는 한국의 페닐케톤뇨증 환자에서는 6.1%에서만 발견이 되었던 돌연변이라고 보고한 바가 있다. 그러나 이 돌연변이는 이번 본 연구에서도 15개의 대립 유전자(7.5%)에서만 발견되었으나 흥미롭게도 양성 고페닐알라닌혈증과 BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증의 경우에는 각각 40%와 37%로 높은 빈도를 나타내고 있다. Guldberg 등<sup>22)</sup>의 연구에서는 유전자형 R241C를 양성 고페닐알라닌혈증에 포함시키기도 하였다. 그 후 Kure 등<sup>23)</sup>은 R241C/R413P 환자들의 혈중 페닐알라닌 농도가 BH<sub>4</sub>를 경구로 복용하면서 감소한다는 사실을 보고하였다. R241C는 조효소가 결합하는 부위에 가까이 위치하고 있고 조효소와는 직접 상호작용을 하지 않기 때문에 돌연변이가 생겨도 비교적 경한 구조적 이상을 나타내는 것이다<sup>24)</sup>. 본 연구에서도 전형적인 페닐케톤뇨증에서는 R413P가 3.7%, R241C는 0.6%로 확인된 반면 BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증과 양성 고페닐알라닌혈증 환자의 경우 R241C가 각각 33.3%와 40%로 이러한 이전 연구 결과들과 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

BH<sub>4</sub> 결핍증은 조효소인 BH<sub>4</sub>의 합성과 재생 경로에 효소의 결함이 생겨서 발생하는 상염색체 열성으로 유전되는 대사질환이다. Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase(PTPS) 결핍증 환자와 페닐케톤뇨증 환자의 BH<sub>4</sub> 반응 양상은 조금은 차이를 보인다. BH<sub>4</sub> 결핍증은 과거에는 악성 또는 비전형적 페닐케톤뇨증이라고 불렸었고 결국 고페닐알라닌혈증을 일으키는 질환으로 PTPS 결핍증과 dihydropteridine reductase(DHPR) 결핍증 두가지가 가장 흔한 형임이 밝혀졌다<sup>6)</sup>. PTPS 결핍증 환자에서 BH<sub>4</sub>를 복용했을 경우 페닐알라닌 농도는 극적으로 그리고 완전히 정상 농도까지 떨어지는 양상

이 관찰되었고 페닐케톤뇨증 환자의 경우는 상대적으로 점차적으로 감소하는 소견을 볼 수 있었으나 혈중 페닐알라닌 농도는 정상보다는 높게 유지되는 양상이 관찰되었다. 그리고 몇몇 페닐케톤뇨증 환자들의 경우에는 BH<sub>4</sub>에 전혀 반응하지 않는 소견을 보였으며 이러한 결과로 미루어 보았을 때 BH<sub>4</sub>에 반응을 하려면 남은 효소 활성도가 조금이라도 필요하다는 것을 알 수 있으나 모든 경한 표현형이 꼭 BH<sub>4</sub> 반응성과 연관이 있지는 않았다. 그리고 본 연구에서 발견된 것과 같이 BH<sub>4</sub>에 반응하는 환자 군을 나누어 관찰한 경우 약물 치료만 가능한 경우의 유전자 변이와 약물치료만으로는 부족하여 식사 요법과 같이 병행해야 하는 경우의 유전자 변이들이 발견되어 치료와 예후를 예측하는데 많은 도움이 되고 있다. 본 연구의 결과에 따르면 약으로만 또는 약과 식사요법을 병행해야 조절되는 경우 모두 R241C가 가장 많았으며 그 외 공통적으로는 A259T, R243Q, G344D, R111X 등이 있었다. T278I와 V388M같은 경우는 약으로만 치료되던 군에서 나타났으며 이들은 비교적 예후가 좋을 것으로 추정할 수 있고, 반면 K95del과 A447P 등의 경우는 식사요법을 병행하는 경우로 예후가 비교적 좋지 않을 것으로 추정된다.

PAH 유전자 돌연변이에 대한 연구들이 계속 진행되면서 새로운 유전자 변이들이 속속히 발견되고 있다. 이와 함께 다양한 진단방법들이 개발되고 도입되고 있으며 치료가 가능한 유전자 변이들의 유전자형들이 확인되면서 이러한 PAH 유전자 분석이 페닐케톤뇨증 환자에서 진단, 유전 상담, 식사요법과 치료계획 수립에 기여하고 있다고 사료된다.

## 한글요약

**목적** : 페닐케톤뇨증은 상염색체 열성으로 유전되는 아미노산 대사질환으로 PAH와 조효소인 BH<sub>4</sub>의 활성이 저하되어 발생한다. 본 연구에서는 PAH 유전자 돌연변이와 임상양상과의 연관성을 조사하였고 PAH DNA 변이의 국가간의 차이를 분석하였다.

**방법** : 페닐케톤뇨증 환자와 환자 가족의 동의하에 DNA를 말초혈액의 백혈구에서 분리하여 PAH 유전자를 PCR을 통해 증폭하여 유전자 서열을 분석하였고 PAH 돌연변이가 하나의 대립유전자에서만 발견이 되거나 없는 경우는 분석된 서열을 MLPA를 시행하여 분석을 하였다.

**결과** : 유전자 검사를 시행한 102명의 대립유전자 204개 중 199개의 돌연변이가 발견되어 97%의 검출률을 보였다. 발

견된 돌연변이는 총 44가지의 유전자형으로 9개는 novel missense mutation이었고 1개는 novel splice site mutation이었다. 가장 많은 대립 유전자형은 R243Q와 IVS4<sup>-1</sup>G>A로 각각 13.1%와 11.6%를 나타내었다. 전형적 페닐케톤뇨증에서는 R243Q와 IVS4<sup>-1</sup>G>A가 각각 14.2%를 차지하였고 BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증의 경우에는 R241C가 33.3%, 양성 고페닐알라닌혈증이 R241C가 40%에서 나타났다. BH<sub>4</sub> 반응형 페닐케톤뇨증의 경우에는 약물 치료만으로 조절이 되는 환자에서 T278I와 V388M mutation이 발견되었고 약물 치료만으로 조절이 되지 않고 식사요법을 병행해야 하는 환자들에서만 K95del과 A447P의 돌연변이가 나타났다. 그리고 2004년 이전에는 동양인에게서 A259T 대립유전자 돌연변이가 발견되지 않은 것으로 보고되었으나 본 연구에서는 10.1%에서 발견되었다.

**결론** : 페닐케톤뇨증과 관련된 새로운 유전자 변이들이 발견되고 있으며 BH<sub>4</sub>에 반응하는 유전자 변이들의 유전자형들이 확인되면서 PAH 유전자 분석은 페닐케톤뇨증 환자에서 진단, 유전상담, 식사 요법과 치료 계획 수립에 기여할 것이다.

## 참고문헌

- 1) 전광필, 서영순, 김재경, 서세모, 윤덕진. 3례에서 본 phenylketonuria의 임상적 관찰. 소아과 1966;9:91-6.
- 2) 남혜경, 심진섭, 이동환, 이상주, 차기원, 임정빈. 페닐케톤뇨증의 임상적 고찰. 소아과 1992;35:69-79.
- 3) 정철희, 이혜용, 이동환, 이상주, 차기원, 임정빈. 한국 페닐케톤뇨증 환자에서 Pterin, DHPR의 측정과 DNA 분석. 소아과 1993;36:1681-90.
- 4) Lidzky AS, Robson KJH, Thirumalachary C, Barker PE, Ruddle FH, Woo SLC. The PKU locus in man is on chromosome 12. Am J Hum Genet 1984;36:527-33.
- 5) Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Levy H. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: A systematic literature review and meta-analysis. Mol Genet Metab 2007;92:63-70.
- 6) O'Neil CA, Eisensmith RC, Croke DT, Naughten ER, Cahalane SF, Woo SL. Molecular analysis of PKU in Ireland. Acta Paediatr 1994;Suppl 407:S43-S4.
- 7) Ounap K, Lillevali H, Metspalu A, Lipping-Sitska M. Development of the phenylketonuria screening program in Estonia. J Med Screen 1998;5:22-3.
- 8) Schuler A, Somogyi C, Toros I, Pataki L, Mete M, Kiss E, et al. A longitudinal study of phenylketonuria based on the data of the Budapest Screening Center. Eur J

- Pediatr 1996;Suppl 155:S50-S2.
- 9) Szabo L, Somogyi C, Mate M. Experience based on 800,000 newborn screening tests of the Budapest Phenylketonuria Centre. *Acta Paediatr Hung* 1985;26:113-25.
  - 10) Lugovska R, Vevere P, Andrusaite R, Kornejeva A. Newborn screening for PKU and congenital hypothyroidism in Latvia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999;30(Suppl 2):S52-3.
  - 11) Guldberg P, Henrikson KF, Sipila I, Guttler F. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland *J Med Genet* 1995;32:976-8.
  - 12) Tada K, Tateda H, Arashima H, Sakai K, Kitagawa T, Aoki K, et al. Follow-up study of a nation-wide neonatal metabolic screening program in Japan. A collaborative study group of neonatal screening for inborn errors of metabolism in Japan. *Eur J Pediatr* 1984;142:204-7.
  - 13) Pangkanon S, Rattrisawadi V, Charoensiriwantana W, Techasena W, Boonpuan K, Srisomsap C, et al. Phenylketonuria detected by the neonatal screening program in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34(Suppl 3):179-81.
  - 14) Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H, Zheng XY. Phenylketonuria mutations in Northern China. *Mol Genet Metab* 2005;86(Suppl 1):S107-18.
  - 15) Dobrowolski SF, Ellingson C, Coyne T, Grey J, Martin R, Naylor EW, et al. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene identified in 95 patients with phenylketonuria using novel systems of mutation scanning and specific genotyping based upon thermal melt profiles. *Mol Genet Metab* 2007;91:218-27.
  - 16) Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003;21:345-56.
  - 17) Guldberg P, Levy HL, Hanley WB, Koch R, Matalon R, Rouse BM, et al. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am J Hum Genet* 1996;59:84-94.
  - 18) Kozak L, Hrabincova E, Kintz J, Horoky O, Zapletalova P, Blahakova I, et al. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: Evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet Metab* 2006;89:300-9.
  - 19) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. *Nucleic Acid Res* 2002;30:e57.
  - 20) Desviat LR, Perez B, Ugarte M. Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clinica Chimica Acta* 2006;373:164-7.
  - 21) Okano Y, Hase Y, Lee DH, Furuyama JI, Shintaku H, Oura T, et al. Frequency and distribution of phenylketonuria mutations in Orientals. *Hum Mutat* 1992;1:216-20.
  - 22) Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 1998;63:71-9.
  - 23) Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwanamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-8.
  - 24) Erlandsen H, Stevens RC. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2001;24:213-30.
  - 25) Lee DH, Koo SK, Lee KS, Yeon YJ, Oh HJ, Kim SW, et al. The molecular basis of Phenylketonuria in Koreans. *J Hum Genet* 2004;49:617-21.
  - 26) Aguado C, Prez B, Garca MJ, Belanger-Quintana A, Martinez-Pardo M, Ugarte M, et al. BH4 responsiveness associated to a PKU mutation with decreased binding affinity for the cofactor. *Clinica Chimica Acta* 2007;370:8-12.
  - 27) Jggi L, Zurflh MR, Schuler A, Ponzzone A, Porta F, Fiori L, et al. Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *Mol Genet Metab* 2008;93:295-305.