

윌슨 유전자의 돌연변이 분석: 한국 윌슨병 환자에서의 Arg778Leu 돌연변이

서울대학교 의과대학 소아과, ¹성균관대 삼성서울병원 임상병리과

서 정 기 · 김 종 원¹

Mutation Analysis of Wilson Disease Gene: Arg778Leu Mutation in Korean Children

Jeong Kee Seo, M.D. and Jong-Won Kim, M.D.¹

Department of Pediatrics, Seoul National University, College of Medicine

¹Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Sung Kyun Kwan University
Samsung Seoul Hospital, Seoul, Korea

Background: Wilson disease (WD) is an autosomal recessive disorder of copper transport and characterized by degenerative changes in the brain, liver dysfunction, and Kayser-Fleischer rings due to toxic accumulation of copper. Since the identification of Wilson disease gene (ATP7B), more than 80 mutations have been detected among the different ethnic groups.

Methods: Twenty three children with Wilson disease were included in this study. They were all diagnosed by low serum ceruloplasmin and increased 24 hour urinary copper excretion with characteristic clinical findings.

We analysed WD gene mutation by assessing the nucleotide sequence of exon 7, 8, 9 and 10 including intron-exon boundaries of ATP7B gene from genomic DNA.

Results: Arg778Leu mutation was identified in 16 WD patients; three were homozygous and 13 were heterozygous for this mutation. Of the 46 alleles, 19 alleles had a Arg778Leu mutation (19/46=41%). Homozygote patients had neurologic forms of WD. Arg778Leu mutation was not found among 50 normal healthy persons.

Conclusion: Arg778Leu mutation is a common mutation in Korean WD gene. Arg778Leu mutation screening might be used as a useful supplementary diagnostic test in some patients to confirm Wilson disease in Korea. (*J Korean Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 2: 164~168)

Key Words: Wilson disease gene, Mutation

접수 : 1999년 6월 25일, 승인 : 1999년 6월 28일

책임저자 : 서정기, 110-744, 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 어린이병원 소아과

Tel: 02) 760-3627, 3468, Fax: 02) 743-3455

서 론

윌슨병(Wilson disease)은 상염색체열성으로 유전하는 구리 대사 이상 질환으로 구리의 담도 배설 장애로 인하여 구리가 간, 뇌, 각막, 적혈구, 신장 등에 침착하여 간염, 간경화등 간 기능장애, 신경장애, Kayser-Fleischer ring, 용혈성 빈혈, 신세뇨관 기능 이상 등을 초래한다.

이 질환은 4~5세경부터 증상이 나타나기 시작하며 조기 진단이 특히 중요한데 만성 간 질환 중 에서 완치 가능한 드문 질환의 하나이며 또한 기저핵에 병변을 보이는 신경계질환 중 유일하게 치료될 수 있는 질환이기도 하다^{1,2)}.

이 질환을 일으키는 결손 유전자의 빈도는 세계적으로 90명당 1명의 빈도를 보이는 것으로 생각된다. 동유럽의 유대인 윌슨병 환자에 대한 조사³⁾와 Passwell의 아랍 및 유대인 환자들에 대한 조사⁴⁾에서 종족 별로 서로 다른 임상 발현과 경과를 보이는 것으로 알려져 있어 아마도 종족 간에 유전자 변이의 차이가 있을 것으로 추측되어 왔다.

Frydman이 처음 연관분석⁵⁾을 시작한 이래 윌슨병 유전자가 발견되기 전까지 본 연구자들은 10명의 윌슨환아가족에 대한 연관분석을 시행하였고, 이중 일곱 가족에 대한 결과를 보고한 바 있으며⁶⁾, 또한 이들 10 가족에 대한 결과를 전세계의 환자들의 분석과 함께 공동으로 발표한 바 있다⁷⁾.

최근에 확인된 윌슨병 유전자(WND)는 구조상 P type copper dependent ATPase라고 생각되고 있다^{8~10)}. 이 유전자는 80 kb에 이르는 genomic DNA로 22개의 exon과 4.3 kb cDNA로 구성되어 있다. 이 유전자는 비교적 크므로 돌연변이의 빈도가 높다고 알려진 Exon 8을 포함한 Exon 7, 8, 9, 10에 대하여 한국인 윌슨병환자의 돌연변이형에 대한 분석을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

(1) 환자군의 선정: 임상적인 증상과 카이제르 플라이세르륜(Kayser-Fleischer ring)의 유무, 혈청 세룰로플라스민, 24시간 요중 구리농도 등을 통하여 임상적으로 확진되어 치료 및 경과 추적을 하고 있는 23명의 어린이 윌슨환자를 대상으로 하였다.

(2) 검체 채취 및 보관: 검체는 EDTA tube를 사용하여 정맥혈을 채취하였으며, Genomic DNA 분리는 Lysis buffer에 의해 세포를 용해시킨 후 proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하여 56°C water bath에 3시간 이상 incubation하였다. 동량의 phenol, chloroform으로 단백제거 후 100% ethanol과 3M sodium acetate로 genomic DNA를 추출하였다. 또한 환자 부모의 검체를 함께 채취하여 분석하였다.

(3) Genomic DNA의 PCR: 추출한 genomic DNA를 exon 7부터 exon 10까지 각각 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 2분 30초로 35 cycle을 수행하였다. PCR 산물을 1% agarose gel로 확인한 후 gel로부터 Quiagen extraction kit (USA)를 사용하여 PCR 산물을 추출하였다.

(4) PCR product의 sequencing (Perkin Elmer-Dye terminator sequencing kit 사용): PCR product, primer (3.2 mole), terminator ready reaction mix를 섞어 96°C 30초 50°C 15초 60°C 4분으로 25 cycle의 cycle sequencing을 수행한 후 spin-column에 의해 각 산물을 정제하였다. 정제한 산물은 ABI prism 377 automatic sequencer로 분석하였다.

(5) 돌연변이의 확진: 돌연변이가 확인된 경우 해당 돌연변이 부분에 대하여 제한효소를 이용하여 확인하고, 부모의 검체에서도 돌연변이 여부를 확인하였다.

결 과

1. Exon 7, 8, 9, 10의 증폭

각 Exon의 증폭은 Fig. 1과 같다.

2. 돌연변이의 발견

Exon 8에서 2336번째 cDNA에서 G->T 변이로 인하여 778번째 아미노산이 arginine에서 leucine으로 변이된 돌연변이가 발견되었다(Fig. 2). 이 돌연변이는 정상인 50명에서는 발견되지 않았으나, 일부 환자의 부모에서 확인되었다. 염기서열 분석으로 발견된 돌연변이를 제한효소분석을 통하여 확

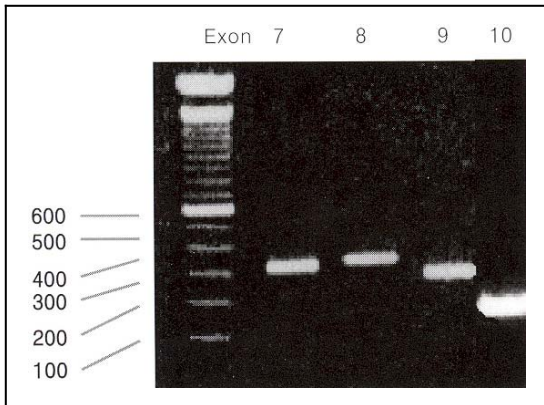


Fig. 1. PCR product of Exon 7, 8, 9, 10 of ATP7B gene.

인하기 위하여 Exon 8 부분을 PCR 조건에 의해 증폭 한 후 total 20 ul volume에서 PCR product 10 ul, Msp I (Gibco BRL) 10 unit를 혼합하여 37°C 3시간 동안 incubation하였다. 그런 후 1% agarose gel로부터 enzyme cutting을 확인하였다. 이 결과는 Fig. 3과 같다.

23명의 환자에서 3명의 동형접합체(homozygote)를 발견하였고, 13명의 이형접합체(heterozygote)를 발견하였다. 그러므로 총 46개의 염색체로부터 16개의 Arg778Leu 돌연변이를 발견하여 41% (19/46)의 빈도를 확인하였다.

3. 임상상의 확인

동형 접합체를 보인 환자들에 대하여 임상상을 분석한 결과 2명은 15세와 17세에 각각 신경증상을 주증상으로 발현한 환자들이었고, 나머지 1명은 이들 신경증상을 보인 월슨환자 2명중 1명의 동생으로 검사 당시 10세이나 아직까지 임상적 증상을 보이지 않았다.

고찰

월슨병 유전자인 ATP 7B에 대한 월슨병 환자의

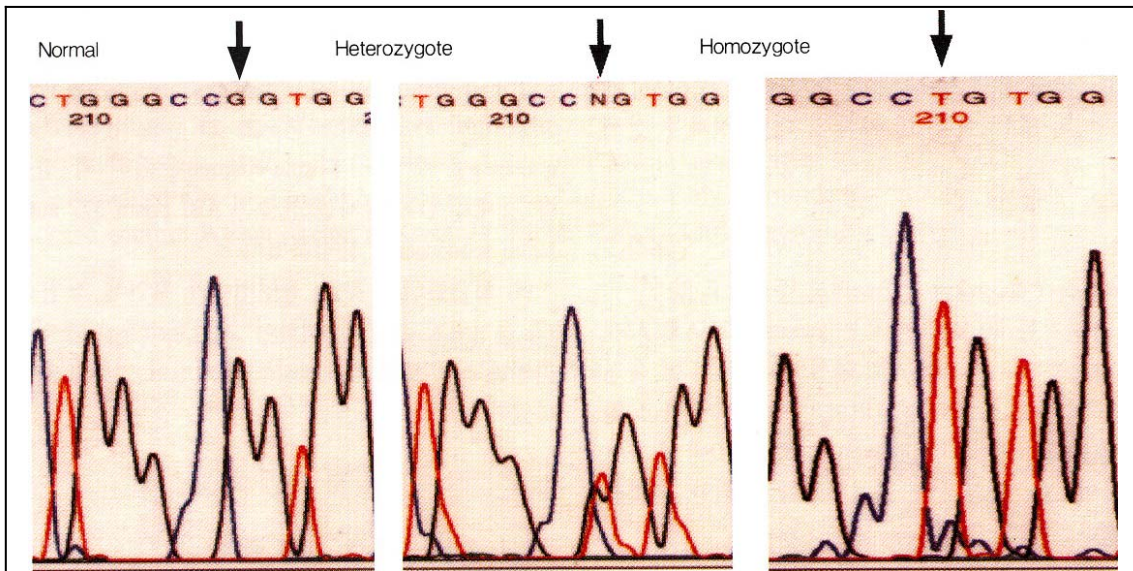


Fig. 2. Arg778Leu mutation analysis result.

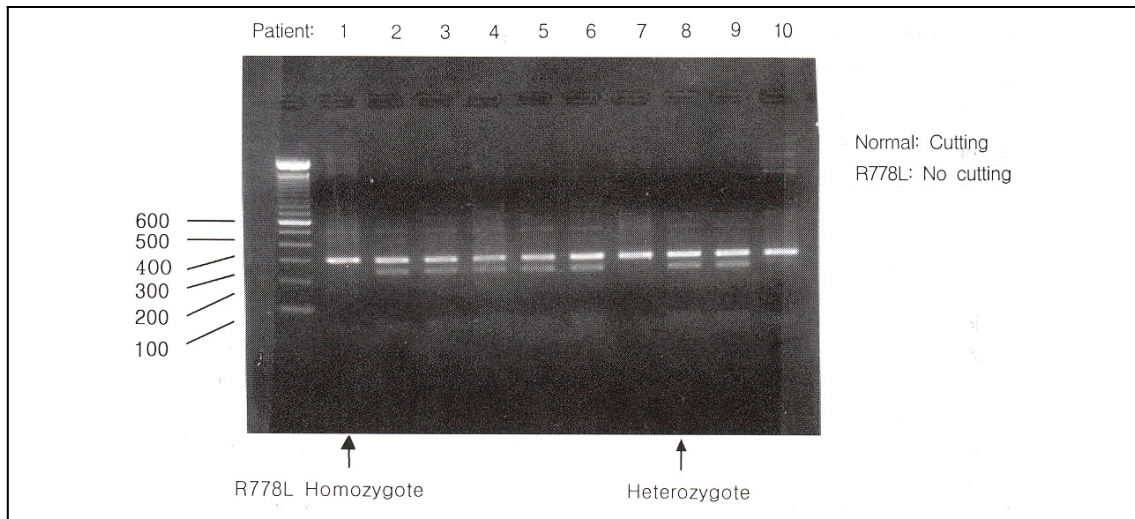


Fig. 3. Arg778Leu mutation screening in WD patients.

돌연변이 분석은 genomic DNA에 기초하여 SSCP로 발견한 것이 현재 약 80개 이상 보고되고 있다¹¹⁻¹³). 이들의 분석결과는 주로 서양백인과 지중해 지방 환자들을 대상으로 하여 이루어지고 있으며, 최근 일본인 율슨병 유전자 돌연변이에 대한 보고도 발표되고 있다¹⁴).

돌연변이 분석결과 His714Gln 돌연변이가 50명 미국 율슨병 환자의 31%를 차지하는 것으로 나타났으며, 38명 유럽인 환자에서는 22%를 차지하고 있는 것으로 나타나고 있다.

또한 1 bp del 2337은 18명 러시아인 환자의 20%에서 나타나는 것으로 보고된 바 있다. 또한 His1070Gln 돌연변이는 환자 28%에서 나타나는 것으로 분석되고 있다.

그러나 이러한 돌연변이가 본 연구에서 조사한 한국인에서는 발견되지 않았다.

본 연구의 한국인 23명 분석에서는 Arg778Leu 돌연변이가 전체 환자 allele의 빈도에서 41%를 차지하는 것으로 나타나 매우 흔한 돌연변이임을 확인할 수 있었다. 임상적 발현의 다양성과 돌연변이형의 분석에서는 본 연구의 결과를 보면 Arg778Leu 돌연변이가 homozygote인 경우 증상이 발현된 환자에서는 모두 신경형의 율슨병 환자였다.

ATP7B 유전자는 7개의 transmembrane domain을 가지며, 6개로 추정되는 metal binding domain을 가지고 있는 것으로 생각되고 있다¹⁴). Arg778Leu 돌연변이는 4번째 transmembrane domain에 존재하는 것으로 생각되며, 돌연변이의 효과는 본 연구의 환자 임상상에서도 추측되는 것처럼, ATP 7B 유전자 기능의 장애가 간 손상형을 일으키는 돌연변이보다 상대적으로 적을 것으로 생각된다. 이 돌연변이가 founder effect를 가지는데 대해서 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며, 또한 다른 exon에 대한 분석이 필요하다고 생각된다. 그러나, 현재의 연구결과에서 밝혀진 바와 같이 Arg778Leu 돌연변이는 매우 흔한 돌연변이로써 이 돌연변이는 비교적 쉽게 중합효소반응과 제한효소 처리로 찾아 낼 수 있으므로 임상적으로 의심이 되나 기존의 진단 검사로 확진이 어려운 율슨병 환자에서 진단적 유용성이 있을 것으로 생각된다.

최근 중국에서 Arg778Leu 돌연변이의 빈도가 30%로 보고된 바 있다¹⁵). 이 돌연변이가 일본인에서도 가장 흔한 돌연변이지만 12%의 빈도로 보고되고 있는 것으로 보아서 일본인 환자와 한국인 환자들 사이의 연관성에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다. 그러나 대조적으로 같은 exon 8에서

일본인 환자에서 2.4%의 빈도로 관찰되는 2164insT, 2203del29, 2299insC 등¹⁶⁾ 다른 돌연변이가 본 연구의 우리나라 환자에서는 관찰되지 않았다. 향후 다른 exon과 promotor를 포함한 부위의 염기서열 분석에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 서정기, 문형로. 소아기의 비virus성 간염-치료가능한 Wilson씨병의 발현-. 대한소화기병학회잡지 1983; 15(2): 217-26.
- 2) Sheinberg IH, Sternlieb I. Wilson's disease. Philadelphia: WB Saunders, 1984.
- 3) Bearn AG. A genetical analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). Ann Hum Genet 1960; 24: 33-43.
- 4) Passwell J, Garfinkel D, Streiffler M, Cohen BE. Heterogeneity of Wilson's disease in Israel. Israel J Med Sci 1977; 13(1): 15-19.
- 5) Frydman M, Bonne-Tamir B, Farrer LA, et al. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 1819-21.
- 6) 김종원, 김상인, 서정기. 한국인 윌슨병 가족의 유전적 연관분석에 관한 연구. 소아과 1993; 36(11): 1596-612.
- 7) Stewart EA, White A, Tomfohrde J, Osborne-Lawrence S, Prestridge L, Bonne-Tamir B, et al. Polymorphic microsatellites and Wilson disease (WD). Am J Hum Genet 1993; 53: 864-73.
- 8) Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nature Genetics 1993; 5: 344-50.
- 9) Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. Nature genetics. 1993; 5: 338-43.
- 10) Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. Nature Genetics 1993; 5: 327-37.
- 11) Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. Nature Genetics 1995; 9(2): 210-7.
- 12) Thomas GR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotypes and mutations in Wilson Disease. Am J Hum Genet 1995; 56: 1315-9.
- 13) Figus A, Angius A, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi A, et al. Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations. Am J Hum Genetics 1995; 57: 1318-24.
- 14) Petrukhin K, Lutsenko S, Chenov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. Characterization of the Wilson Disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. Human Mol Genet 1994; 3(9): 1647-56.
- 15) Xu Y, Fan Y, Yu L, Jiang Y, Yang R, Han Y, Cui Y, Ren M, Zhaos, et al. Identification of a mutation hot spot in exon 8 of Wilson's disease gene by cycle sequencing. Chung Hua [Hsuh] Chuan Hsueh Tsa Chin 1998; 15(5): 284-7.
- 16) Nanji MS, Nguyen Van TT, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, Nakajima T, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. Am J Hum Genet 1997; 60: 1423-9.