

한국인 당원병 제 Ia형 환자의 돌연변이 분석

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 임상병리과, 삼성생명 과학연구소,
¹서울대학교 의과대학 소아과학교실

김 종 원 · 박 지 연 · 서 정 기¹

Mutation Analysis of Korean Patients with Glycogen Storage Disease Type Ia

Jong Won Kim, M.D., Ji Yeon Park, M.D. and Jeong Kee Seo, M.D.¹

Department of Clinical Pathology, Samsung Medical Center, School of Medicine,
Sungkyunkwan University, and Samsung Biomedical Research Institute

¹Department of Pediatrics, Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Glycogen storage disease type Ia (GSD Ia) is an autosomal recessive disorder of glycogen metabolism caused by glucose-6-phosphatase (G6Pase) deficiency. The clinical manifestations of G6Pase deficiency include growth retardation, hepatomegaly, hypoglycemia, lactic acidemia, hyperlipidemia and hyperuricemia. Many mutations of this gene have been found worldwide in various ethnic groups, establishing the molecular basis of GSD Ia. To elucidate a spectrum of the G6Pase gene mutations in Korean, we analyzed mutations in Korean patients with GSD Ia.

Methods: Both alleles of 9 unrelated GSD Ia patients were studied by PCR and direct DNA sequencing methods. In all patients, GSD Ia was diagnosed by the enzyme assay for the liver biopsy specimen.

Results: In Korean, the most prevalent mutation was g727t substitution in exon 5, which has been reported to cause abnormal mRNA splicing: Sixteen out of 18 alleles were found to have this mutation. In addition, we identified one novel mutation, a c611g, converting a proline to an alanine at codon 178.

Conclusion: Our findings suggest that a screening for the g727t mutation by noninvasive molecular method can detect most cases of GSD Ia in Korean patients. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 4: 213~217)

Key Words: Glycogen storage disease type Ia, GSD, Glucose-6-phosphatase, Mutations, Korean

접수 : 2001년 9월 10일, 승인 : 2001년 9월 18일

책임저자 : 서정기, 110-744, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 02-760-3570, Fax: 02-743-3455, E-mail: jkseoo@plaza.snu.ac.kr

서 론

당원축적증(Glycogen storage disease, GSD)은 당의 대사과정에 관계되는 효소의 결핍으로 인하여 glycogen이 장기 내 축적되는 선천성 대사이상 질환이다. 결핍 효소에 따라 10여종 이상의 아형이 알려져 있으며, 그 중 glucose 6-phosphatase (G6Pase)의 catalytic unit 결핍으로 인한 GSD Ia형(von Gierke disease)이 가장 많다. GSD I형은 상 염색체 열성 유전에 따르며, 출생 시부터 복부팽만과 간종대가 나타나는 수가 많고, 저혈당, 락트산혈증(lactic acidemia), 고지방혈증(hyperlipidemia), 고노산혈증(hyperuricemia) 등을 초래하며 점차 성장발육부전이 된다¹⁾.

아직까지 효소결핍에 대한 근본적인 치료는 없으며 과거에는 문맥하공 정맥 문합술을 많이 사용하였으나, 최근에는 생육수수 전분 경구투여가 이병에 대한 표준적인 대증요법으로 자리잡고 있다²⁾.

GSD Ia형에서 결핍효소로 알려진 G6Pase는 주로 간과 신장에서 발견되고, glycogenolysis와 gluconeogenesis 과정에 필수적인 역할을 하는 효소이다. G6Pase 유전자의 구조와 염기서열이 밝혀진 후, G6Pase 유전자의 돌연변이에 대한 분자 수준의 연구가 활발히 진행되어왔다. G6Pase 유전자는 5개의 exon으로 구성되어 있고 17번 염색체에 12.5 kb에 이르는 비교적 작은 유전자이다³⁾.

지금까지 전세계적으로 50개가 넘는 돌연변이 종류가 보고되었으며, 종족마다 유전적 변이의 차이가 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 중국, 일본에서도 GSD 환자의 G6Pase 유전자 돌연변이에 대한 보고가 있었는데, 백인계 환자가 많이 가지고 있는 변이의 종류와 많은 차이를 보이는 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서는 한국인 GSD Ia 환자 9명을 대상으로 G6Pase 유전자의 돌연변이형에 관한 분석을 처음으로 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교병원, 삼성서울병원에서 임상적인 증상과 간 생검조직에서 G6Pase 효소를 측정하여 GSD Ia로 진단된 9명 환자를 대상으로 하였다.

2. 돌연변이 분석

환자의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 G6Pase 유전자의 5개 exon 부분이 포함되도록 polymerase chain reaction (PCR)을 하였다. 각 exon을 증폭하기 위한 primer는 Lei et al. (1993) 논문대로 제작하였으며³⁾, exon 5에 대해서는 한 쌍의 primer를 더 제작하여 사용하였다. 5'-CTCAAGAA-CCTGGGCACGCTC-3' (sense), 5'-TGGAGTTGAG-AGCCAGC-3' (antisense) PCR은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, CT)에서 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초로 35 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 agarose gel로부터 Quiagen extraction kit (USA)를 사용하여 정제한 후, ABI PRISM 377 automated sequencer (PE Applied Biosystem, CA)에서 direct sequencing 하였다.

결과 및 고찰

9명의 GSD Ia 환자에서 G6Pase 유전자를 조사한 결과, 18개 allele 중 17 allele에서 돌연변이를 발견하였다. 7명 환자에서 g727t homozygote 돌연변이를 발견하였고, 한 환자에서는 g727t 돌연변이와 c611g 돌연변이가 각각 heterozygote임을 확인하였다(Fig. 1, 2). 나머지 한 명에서는 g727t 돌연변이 하나만 발견할 수 있었다. 일부 환자의 부모에서 G6Pase 유전자를 조사함으로써 부모가 각각 g727t 돌연변이에 대해서 heterozygote임을 확인할 수 있었다.

대부분의 환자에서 발견된 g727t 돌연변이는 1995년 일본에서 처음 보고되었으며, 염기치환(g t) 하나가 intron 4의 mRNA splicing에 이상을 일으켜

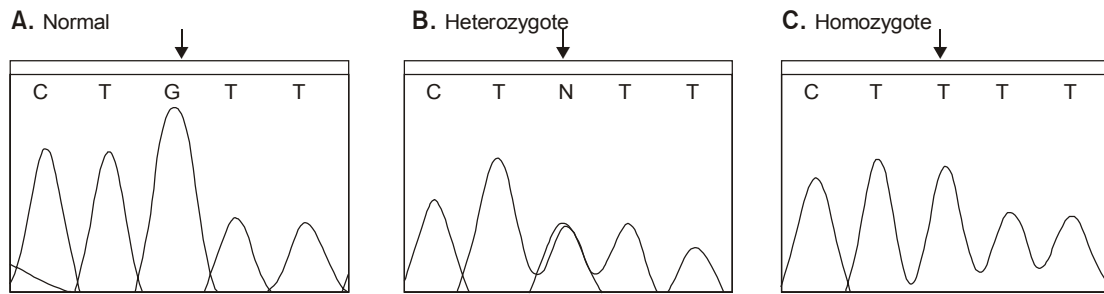


Fig. 1. G727T mutation analysis.

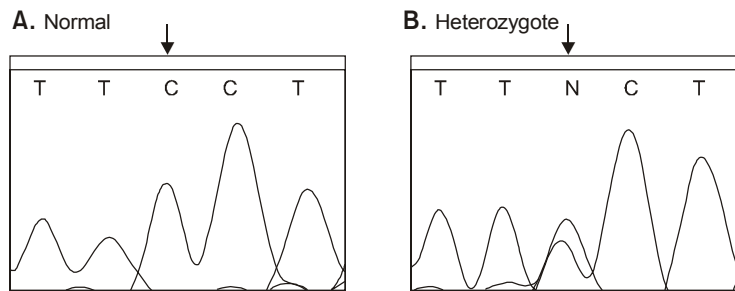


Fig. 2. C611G mutation analysis.

exon 5의 5'쪽 91개 염기가 함께 splicing되는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 이 g727t 돌연변이는 일본인 GSD 환자에서도 가장 우세한 빈도(88%)를 보였으나 서양인에서는 거의 발견되지 않았다. 이와 같은 결과로 일본인 환자와 한국인 환자 사이에 강한 연관성이 있음을 추측할 수 있다.

한 개의 allele에서 발견된 c611g 돌연변이는 exon 4의 178번 아미노산 proline이 alanine으로 변경되는 것으로 지금까지 보고된 바 없는 새로운 돌연변이이다. 이 돌연변이는 9개의 transmembrane domain 중 5번째에 존재하며, G6Pase의 효소활성 부위 중 하나인 His176 근처에 있는 것으로 볼 때 효소활성에 상당한 영향을 미칠 것으로 생각된다⁹⁾. 같은 위치의 다른 missense 돌연변이(c611t, P178S)가 라틴 아메리칸 환자 한 명에서 관찰되었는데, 이 경우 G6Pase 효소 활성도가 거의 사라짐을 transient expression 실험을 통해 보여주었다¹⁰⁾.

민족마다 빈도가 높은 돌연변이 유형이 다양한데, 백인계 환자의 경우 R83C, Q347X, 중국인 환

자에서는 R83H, 일본인 환자에서는 g727t splicing 돌연변이가 특징적으로 많이 나타났다. 특히, G6Pase 효소활성화 부위(active site) 중 하나인 83번 arginine에서 돌연변이가 백인과 중국인 당원병 환자들에서 많이 나타났으나, 조사한 한국인에서는 발견되지 않았으며, 일본인에서도 드물게 나타나는 유형인 것으로 알려졌다^{10,11)}.

18개 allele 중 1개 allele에 대해서는 조사한 부분에서 어떤 돌연변이형도 찾을 수 없었다. G6Pase의 coding 부분만을 PCR하여 sequencing하였기 때문에 그 외의 부분에 존재할 수도 있는 돌연변이에 대한 연구가 보충되어야 할 것이다. 또한, 지금까지 G6Pase promoter에서 발견된 돌연변이는 없었지만, G6Pase의 발현에 중요한 부분들이 promoter 부위에 있음이 알려져 있기 때문에, promoter를 포함한 부위의 염기서열 분석에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다¹²⁾.

대상으로 한 환자의 수가 적긴 했지만, 본 연구에서 조사한 한국인에서는 2가지 유형의 돌연변이

만이 발견되었다. 또한 한국인 GSD Ia 환자의 경우 g727t 돌연변이가 대부분을 차지하기 때문에 한국인 GSD Ia 진단에 있어 먼저 이 부분을 조사하면 90% 이상의 확률로 진단이 가능할 수 있으리라 생각된다.

현재까지 GSD Ia에 대한 정확한 진단을 위해서 환자의 간 조직을 생검하여 G6Pase 효소의 활성도를 측정하는 것이 필요하였다. 앞으로 G6Pase 유전자 분석을 통한 GSD 진단이 확립되어진다면, 간 조직을 채취하는 방법 대신 혈액 검사만으로도 간단하게 진단이 가능해질 것이다. 또한, 보인자(carrier) 검사나 태아에 대한 출생 전 검사도 용이해질 것이다.

요 약

목 적: 당원병 Ia형(von Gierke disease)은 glucose 6-phosphatase (G6Pase)의 결함으로 인하여 출생 시부터 복부팽만과 간종대가 나타나고 저혈당, 락트산혈증(lactic acidemia), 고지방혈증(hyperlipidemia), 고노산혈증(hyperuricemia) 등을 초래하며 점차 성장발육부전이 진행되는 상염색체 열성 유전성 질환이다. 본 연구에서는 한국인 GSD Ia 환자 9명을 대상으로 G6Pase 유전자의 돌연변이형에 관한 분석을 처음으로 시행하고자 하였다.

방 법: 임상적인 증상과 G6Pase 효소 측정결과를 통하여 GSD Ia로 진단된 9명 환자의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 G6Pase 유전자의 5개 exon 부분이 포함되도록 polymerase chain reaction (PCR) 한 후 PCR 산물을 direct sequencing 하였다.

결 과: 9명의 GSD Ia 환자 중 7명 환자에서 g727t homozygote 돌연변이를 발견하였고, 한 환자는 heterozygote로서 g727t 돌연변이와 c611g 돌연변이가 발견되었다. 나머지 한 명에서는 g727t 돌연변이 하나만 발견할 수 있었다. 한 개의 allele에서 발견된 c611g 돌연변이는 exon 4의 178번 아미노산 proline이 alanine으로 변경되는 것으로 지금까지 보고된 바 없는 새로운 돌연변이이다.

결 론: 현재까지는 GSD Ia병의 정확한 진단을

위해서 환자의 간 생검 조직에서 G6Pase 효소의 활성도를 측정하는 것이 필요하였으나 한국인 GSD Ia 환자의 경우 g727t 돌연변이가 대부분을 차지하고 있기 때문에 앞으로는 상당수의 환자에서 혈액 채취만으로도 G6Pase 유전자 분석을 통한 GSD 진단이 손쉽게 이루어질 수 있으리라고 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Wolfsdorf JL, Holm IA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases: Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:801-23.
- 2) 이선영, 서정기. 소아의 간성 당원 축적증에서 생육수수 전분의 치료효과에 대한 연구. *소아과* 1995;38:36-46.
- 3) Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 1993;262:580-3.
- 4) Rake JP, ten Berge AM, Visser G, Verlind E, Nieren-Koning KE, Buys CHCM, et al. Glycogen storage disease type 1a: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flowchart. *Eur J Pediatr* 2000;159:322-30.
- 5) Kajihara S, Matsuhashi S, Yamamoto K, Kido K, Tsuji K, Tanae A, et al. Exon redefinition by a point mutation within exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage disease type 1a in Japan. *Am J Hum Genet* 1995;57:549-55.
- 6) Okubo M, Aoyama Y, Kishimoto M, Shishiba Y, Murase T. Identification of a point mutation (G727T) in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type 1a, and carrier screening in healthy volunteers. *Clin Genet* 1997;51:179-83.
- 7) Akanuma J, Nishigaki T, Fujii K, Matsubara Y, Inui K, Takahashi K, et al. Glycogen storage disease type 1a: molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of splicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells. *Am J Med Genet* 2000;91:107-12.

- 8) Takahashi K, Akanuma J, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Suzuki Y, et al. Heterogeneous mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia. *Am J Med Genet* 2000;92:90-4.
 - 9) Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrika W, Chou JY. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 1998;273:6144-8.
 - 10) Lei KJ, Chen YT, Chen H, Wong LJC, Liu JL, McConkie-Rosell A, et al. Genetic basis of glycogen storage disease type Ia: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. *Am J Hum Genet* 1995; 57:766-71.
 - 11) Chou JY, Mansfield BC. Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:104-13.
 - 12) Schmoll D, Wasner C, Hinds CJ, Allan BB, Walther R, Burchell A. Identification of a cAMP response element within the glucose-6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H411E hepatoma cells. *Biochem J* 1999;338:457-63.
-