

과학영재학교 학생들의 알러지 관련 SNP 탐색과 분석

김경원[§] · 이호경[§] · 김현근[§] · 김수영 · 안정훈^{1*}

과학 영재 학교, ¹한국 과학 기술원 과학영재교육연구원

Received August 20, 2004 / Accepted September 24, 2004

Investigation and Analysis of Allergy-related SNPs for Allergy Affected Students in a high school. Kyung-Won Kim[§], Ho-Gyung Yi[§], Hyun-Geon Kim[§], Soo-Young Kim and Jung-Hoon Ahn^{1*}. *Busan Science Academy, #38-31, Tanggam 3-dong, Busanjin-gu, Busan 614-103, ¹Korea Research Institute of Science and Technology, 373-1, Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701* – Allergy is a multi-factorial disease influenced by genetic and environmental factors. As the number of allergy-affected people is increasing in developed countries, there is an increasing interest in genetic predisposition to the allergy. A number of genes and chromosomal region have been identified to be linked to allergy including rhinitis, asthma and atopy. In order to understand the genetic background for the allergy-affected people, we investigated genetic predisposition among students enrolled in Busan Science Academy. Among 138 students, about 30% students had some allergy-related disorder including rhinitis, asthma and atopy. We analyzed several single nucleotide polymorphisms (SNPs) within two genes, Interleukin-4(IL-4) and Interleukin-4 receptor(IL-4R), which are involved in the induction of allergy reaction with the Th2 immunity. For 96 samples obtained from students, we analyzed 9 SNPs including -590 C/T and -34 C/T in IL-4, and I75V, Q576R, E375A, C406R, S411L, S761P and S727A in IL-4R. From the analysis, these SNPs showed slight differences among normal and allergy-affected students, but these differences was not enough to predict the predisposition to the allergy. In contrast to previous reports, we could not find SNP(s) related with allergy. These results suggest that genetic tests recently performed in Korea widely have to be reassessed for its validity of genetic predisposition. [Supported by grants from MOST]

Key words – Allergy, IL-4, IL-4R, SNP

알러지(allergy) 질환은 전 인구의 10-20%에서 관찰될 정도로 흔한 질환으로 그 빈도가 급격히 증가하는 추세이다. 의학적으로 알러지는 면역반응 과도하게 또는 부적절한 형태로 일어나면서 조직손상을 일으키는 면역계의 과민반응으로 천식, 아토피질환, 알러지 비염 등이 대표적인 예이다. 인체에 무해한 항원은 비만세포(mast cell)의 표면에 부착되어 있는 IgE에 교차 결합 시 histamin, Proteoglycan, Leukotrien과 같은 화학적 조절물의 분비와 생성을 자극하여 알러지 반응을 유발한다[5].

비만세포(mast cell)는 IgE의 Fc부분과 결합하는 고친화성 수용기(FcεR1)를 갖고 있으며 B cell이 생산한 IgE가 이 고친화성 수용기에 결합하는 것이 알러지의 발병 메커니즘의 시작이다. 이 IgE의 생산에는 Th2 cell의 도움이 필요하며 Th2 cell은 naïve T cell로부터 유래한다[13]. 이 과정에 중요하게 작용하는 사이토카인이 Interleukin-4 (IL-4)이며 IL-4는 알러지의 유전성의 연구에 있어 가장 주목받는 유전자 중 하나이다[1-3]. IL-4는 B 세포의 isotype switching에 의하여 IgE가 생산되도록 하며 이렇게 생산된 IgE가 비만세포에 결합함

로 알러지가 나타나게 된다[5]. IL-4는 표적세포에 있는 수용체에 결합함으로써 작용하는데 이때 작용하는 수용체가 IL-4 receptor α chain (IL-4Rα)이며 IL-4Rα는 IL-4, IL-13과 같은 알러지 반응에 관계된 사이토카인과 결합하여 알러지 반응이 나타나도록 한다.

알러지는 환경적, 그리고 유전적 요인이 복합적으로 작용하여 발생한다. 또한 유전적 요인도 하나의 유전자가 아닌 복합적인 요인에 기인하기 때문에 찾아내는 것이 쉽지 않다. 하지만 최근에 genetic linkage 연구를 통해 천식과 관련된 ADAM33 [22]을 찾아 낸 것을 비롯하여 알러지와 관련된 염색체 부위가 밝혀지고 있다[7,12,24].

알러지와 연관이 있는 IL-4와 IL-4Rα의 변이에 대해서도 많은 연구가 진행되었다. 현재까지 알러지와 관련이 있는 SNP (Single nucleotide polymorphism)로는 IL-4의 promoter region 에 -590 C/T [16], -34 C/T [21], IL-4Rα의 coding region에 I75V [15], Q576R [9], E375A [17], C406R [17], S411L [17], S478P [11], S761P [6], S727A [6] 등이 있다. IL-4의 promoter region에 변이가 일어나면 IL-4의 생성률이 변하므로 체내 IL-4의 농도가 변하게 되며 exon에 일어난 변이는 생성되는 단백질을 변화시켜 면역계 이상반응을 초래할 수 있다.

알러지의 원인을 유전적 변이에서 찾는 많은 연구들이 진행되어 왔지만 알러지는 매우 복합적인 요인에 의해 발생하

*Corresponding author

Tel : +82-51-606-2127, Fax : +82-51-891-0004

E-mail : hoony@kaist.ac.kr

[§]These authors contributed equally to this work.

는 질병이고 관여하는 유전자도 다양해서 아직 많은 논란이 계속되고 있다. 본 연구는 알리지 반응에 중요하게 작용하는 IL-4와 IL-4Ra에 대하여 현재까지 알려진 알리지 관련 SNP들에 대한 종합적인 검토를 하고 이 SNP들이 한국인에게 적용되는지 확인하기 위해 과학영재학교 학생들을 대상으로 이들 SNP에 대한 조사를 진행하였으며 동시에 IL-4와 IL-4Ra에 밝혀지지 않은 SNP가 있는지에 대해 탐구하였다. 마지막으로 SNP 분석을 통해 알리지에 대한 유전자 검사가 타당한지에 대한 고찰을 하였다.

연구 방법

유전자 검사를 위한 샘플 준비

유전자 검사는 머리카락 모근을 이용하여 실시하였다. 유전자 검사를 위해 피시험자의 모근을 포함한 머리카락을 2-3개 뽑은 후 모근을 포함한 5 mm 정도를 잘라 튜브에 넣고 5% chelax를 100 µl, 10(X) Taq buffer 10 µl와 proteinase K 5 Unit (100 µg/µl)을 넣고 65°C에서 10분간 처리한 후 100°C에서 10분간 끓여서 효소를 불활성화 시킨 후 상등액을 새 튜브로 옮겨 샘플로 사용하였다.

유전자 증폭과 염기서열분석

염기서열 분석을 위해서 위에서 준비된 샘플은 PCR을 통해 유전자를 증폭하였다. 기존의 연구[6,9,11,15,16,17,21]에 기초하여 IL-4의 promoter region 에서 -590C/T, -34C/T와 IL-4R a chain의 coding region에서 I75V, Q576R, E375A, C406R, S411L, S761P, S727A의 염기서열을 분석함으로써 SNP 여부를 확인하기 위해 PCR과정에 필요한 primer를 디자인 했다(Table 1). 유전자 주형으로 위에서 준비된 샘플 5 µl를 전체 PCR 반응 25 µl에 넣어 95°C 15초, 55°C, 20초, 72

°C 1분으로 40 cycle을 통하여 검사하고자 하는 유전자 부분을 증폭하였다. 증폭한 유전자는 염기서열 분석을 위하여 PCR purification kit (Solgent, 한국)을 이용하여 분리하였다. 염기서열은 Big Dye terminator kit (Perkin-Elmer, 미국)으로 반응을 하여 377 ABI automated 96-lane sequencer (Perkin-Elmer)로 분석을 하였다.

MALDI-TOF을 통한 SNP 분석

대량으로 유전자의 SNP를 분석하기 위해 MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization time of flight)을 이용하였다[4]. MALDI-TOF를 통한 SNP 분석에 사용하는 주형(template)으로는 보통 혈액에서 분리된 genomic DNA를 이용하지만 본 실험에서는 머리카락을 이용하였다. 머리카락에서 genomic DNA를 분리하여 실험할 수 없기 때문에 SNP 분석을 위해서 분석하고자 하는 유전자 영역을 Table 1의 primer를 이용하여 위와 같은 조건으로 PCR 증폭하여 이것을 주형으로 이용하였다. MALDI-TOF를 통한 SNP 분석을 위해 사용한 프라이머의 분자량은 5000-7500, Tm은 60°C 이상, 염기 수는 대략 20개 내외를 기준으로 하여 extension primer를 디자인 했다(Table 2).

실험 대상자 96명의 SNP genotyping을 실시하기 이전에 디자인한 extension primer를 사용하여 실험가능성을 분석하기 위해 염기서열 결과를 알고 있는 시료 하나(과거 알지지를 았던 사람)와 pooled DNA sample (100명의 임의의 사람들 DNA) 하나, negative sample (DNA 대신 물을 넣은 것)로 예비실험을 실시했다. 그 결과 염기서열을 알고 있는 시료는 SNP 분석을 통해 extension primer에 예측한대로 염기가 추가되었으며 pooled DNA sample은 SNP의 대략적인 빈도를 파악할 수 있었다. 예비실험 결과를 기초로 96개의 샘플을 선정하고 이들을 MassArray 시스템(Sequenom, Inc)

Table 1. Primers for Sequencing analysis of SNPs

SNPs	Primer name	Primer sequence
-590C/T	IL-4 pro+	5'-TTATGGACCTGCTGGGACCC-3'
	IL-4 pro again-	5'-CAGCATAGGAAATTACACCATAAT-3
-34C/T	IL-4 pro again+	5'-CAGCAGCAGCCCCAAGCTGATA-3'
	IL-4 pro-	5'-GGAAGCAGTTGGGAGGTGAGAC-3'
I75V	I75V+	5'-GGAAGAGTCTGATGCGGTTCC-3'
	I75V-	5'-CAGCCCACAGGTCCAGTGTATAG-3'
Q576R	Q576R+	5'-CAGAGTCCAGACAACCTGACTT-3'
	Q576R-	5'-GAGGTCTTGAAAGGCTTATAC-3'
E375A C406R S411L	IL-4R mid+	5'-TGGAGTGTGAGGAGGAGGAGGA-3'
	IL-4R mid-	5'-CTCCAGGTGGAGAGGCTGCT-3'
S761P S727A	IL-4R ter+	5'-ACCTGTGCGGCCACCTGAAA-3'
	IL-4R ter-	5'-AGCATTGCCAGGGCAGGAT-3'

The amplified PCR products are around 100-400 bp. Sense and anti-sense primers are given for each SNP analysis in the left.

Table 2. Extension primers for SNP genotyping with MALDI-TOF

Primer name	Deign
ex@-590C/T	5'-ACACCTAAACTTGGGAGAACATTGT-3'
ex@I75V	5'-TGTCTGCAGAGCCCACACGTGT-3'
ex@-34	5'-TCGATTTGCAGTGACAATGTGAG-3'
ex@ter2236	5'-CGGACACAGACTGGCCTCCAGTG-3'
ex@ter2301	5'-GGGCAGGATGGAAGGATGATGA-3'
ex@S727A	5'-GGCTGCTGCTGTGGAGACAGG-3'
ex@HG	5'-ATGCCCTGTGTCCCCAGCTCT-3'
ex@Q576R	5'-TGCTCCACCGCATGTACAAACTCC-3'

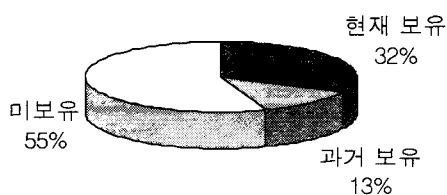
Extension primers were designed immediately upstream or downstream of SNPs to be analyzed. The primers are annealed to the template and are extended by one or two nucleotide through PCR reaction containing dideoxy dNTP (ddNTP).

384 well plate로 옮긴 후 7개의 SNP별로 나누어 SNP를 알아볼 특정 영역을 PCR로 증폭했다. PCR 과정에서 남은 dNTP의 인산기를 제거하여 불활성화 시키기 위해 SAP (shrimp alkaline phosphatase)을 처리하고, 알아보고자 하는 SNP의 바로 앞의 primer를 넣어주고 hME (homologous mass extend) 반응을 통해 primer extension을 했다. 다음으로 desalting 과정을 거쳐 384-well microchip (SpectroCHIP)에 옮긴 후, MALDI-TOF (Bruker BiFlex III)를 이용한 mass spectrometric genotyping 방법으로 SNP genotyping을 했다.

SNP 영역의 PCR 증폭은 아래와 같이 수행하였다. 하나의 샘플을 5 µl로 맞추고, DDW 2.24 µl, 10X PCR buffer 0.5 µl, 25 mM MgCl₂ 0.2 µl, 10 mM dNTP 0.04 µl, Taq (5U/µl) 0.02 µl, PCR primer mix 1 µl을 첨가한 후, 95°C 20초, 56°C 30초, 72°C 1분으로 45 cycle을 PCR 수행했다.

SAP 반응은 SAP Enzyme Solution을 총 2 µl로 맞추고 DDW 1.53 µl, hME buffer 0.17 µl, SAP 0.3 µl을 첨가하여 37°C 20분, 85°C 5분, 4°C 무한대로 설정하여 Thermocycle을 수행했다.

hME 반응은 총 2 µl로 맞추고, DDW 1.512 µl, hME Extend Mix 0.2 µl, extension에 사용하는 hME Primer(20µM) 0.27 µl, Thermo Sequenase 0.018 µl을 첨가하고 94°C 10 sec, 52°C 10 sec, 72°C 10 sec를 40 cycle을 수행한다.



실험결과 및 고찰

알러지 병력에 관한 조사

과학영재학교 1학년 재학생(만 14-16세) 138명을 대상으로 알러지 병력에 관한 설문조사를 실시하였다. 설문조사는 알러지 보유 여부(현재, 과거), 알러지의 종류(천식, 아토피, 비염), 알러지의 심한 정도 및 보유 연수, 알러지 유발 물질, 가족력 등을 포함하였다. 현재 알러지를 보유한 사람들 중 알러지 비염이 38%로 가장 많았고 천식 18%, 아토피 8%, 약물이나 음식에 대한 기타 알러지 질환이 21% 그리고 이들 알러지 질환이 복합적으로 나타나는 사람이 15%의 비율로 나타났다(Fig. 1). 본 연구의 관심 대상은 현재 알러지를 앓고 있는 사람으로 정했으며 알러지의 종류에 대해서는 실험 초기에 감안하지 않기로 하였다. 복합적인 알러지 질환을 나타내는 사람들은 우선적으로 염기서열 분석을 하였으며 이들을 주의하여 SNP 및 유전자 분석을 실행하였다. 실험에 참여한 자원자 96명(현재 환자군 31, 과거 알러지 환자군 12명, 정상 대조군 53명)의 모근을 수집했다.

후보 SNP 선정

서론에서 언급된 바와 같이 알러지 반응에 중요한 역할을 하는 IL-4와 IL-4Ra에 대해 알러지와 관련되었을 것으로 추정되는 SNP를 선정하였다. IL-4Ra는 염색체 16p11.2-12.1에 걸쳐 존재한다. IL-4Ra genomic DNA의 크기가 매우 크기 때문에(약 130kb) 보다 확실한 변화를 가져오는 exon에 대해서만 SNP를 조사하기로 했다. Q576R은 IL-4Ra의 11번째 exon에 있는 SNP로 T가 C로 변이가 일어나 Glu를 생산하던 것이 Arg를 생산하게 하며 천식의 심한 정도와 관련이 있다는 보고가 있다[19]. I75V는 IL-4Ra의 5번째 exon에 있는 SNP로 A가 G로 변이가 일어나 생산단백질이 Ile에서 Val로 바뀌게 되며 아토피에 관여한다는 보고가 있다[10]. IL-4Ra 11번째 exon 자리에 밀집되어 있는 E375A, C406R, S411L 3개의 SNP가 아토피, 천식과 관련이 있으며, 같은 exon의 뒷부분에 있는 S727A, S761P 2가지 SNP는 샘플 수가 적어 확실하진 않지만 관련 가능성이 있다는 보고가 있다[17]. 앞의 3가지를 mid, 뒤의 2가지를 ter라는 영역으로 통합하여 염기서열 분석 및 SNP 분석 실험을 했다(Fig. 2A).

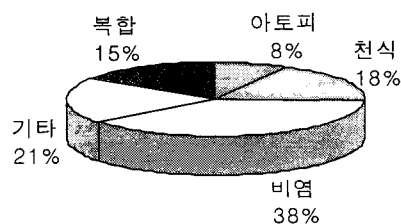


Fig. 1. Survey analysis for allergy. 138 students in Busan Science Academy were surveyed for having allergy in the past or at present. Allergy types were surveyed for persons having allergy at present.

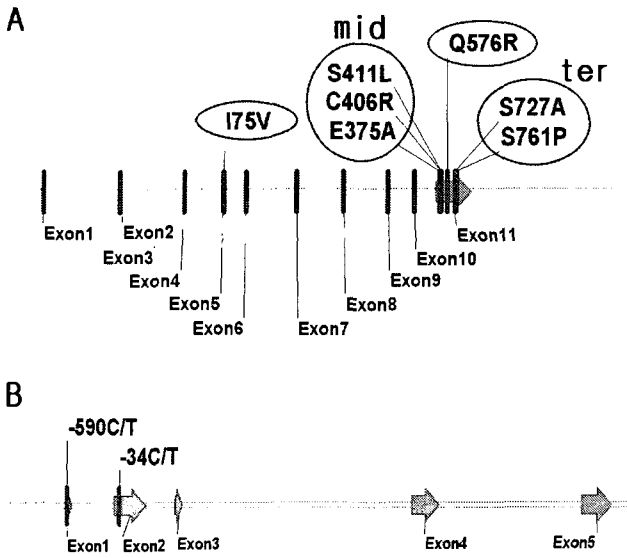


Fig. 2. SNPs in IL-4Ra and IL-4. A. SNPs in IL-4R. Exon 1 to 11 are depicted and SNPs were grouped for analysis as the name of mid and ter. B. SNPs in IL-4. Exons and SNPs are depicted. -590C/T and -34C/T SNPs are located upstream of coding region.

IL-4는 염색체 5q31.1에 존재한다. 선행연구논문의 조사 결과 coding region에는 알려지지와 관련된 SNP가 거의 발표된 바 없고, promoter region에 위치한 SNP에 대해서만 여러 보고가 있어[16,21], promoter region에 대한 SNP를 조사 연구하였다. IL-4 promoter region에 있는 -34C/T가 혈중 IgE 농도의 증가와 관련이 있다는 보고가 있어[8,21] 후보유전자로 채택했다. -590C/T의 T allele이 IgE의 농도증가와 연관이 있다는 보고[14]와 IgE의 농도와는 상관관계가 뚜렷하지 않지만, 천식 환자군에서 T frequency가 높다는 보고가 있어[8, 16], 그림과 같이 SNP를 조사하였다(Fig. 2B).

염기서열분석을 통한예비실험

우선적으로 본 연구팀원과 현재 알려지 환자 군 중 모두 10명을 선별하여 그들의 모근으로부터 DNA를 뽑아 PCR하여 염기서열을 밝혔다. 염기서열 분석 결과에 기초하여 기존에 알려진 SNP와 밝혀지지 않았으나 SNP로 추측되는 변이 중 알려지와 유관할 것으로 추정되는 변이를 총 8개 선정했다. 염기서열 분석 결과 IL-4Ra mid+와 IL-4Ra mid-로 PCR했던 부분에 있던 3가지 SNP (E375A, C406R, S411L)에서는 환자군을 포함하여 아무런 변이가 발견되지 않아 Mass spectrometric genotyping에서 제외시키기로 최종 결정하였다. 또한 IL-4Ra ter+와 IL-4Ra ter-로 PCR했던 부분에서 SNP로 추정되는 변이가 2개 발견되었다. 하나는 ter2236 (2236은 IL-4Ra의 start codon을 1번 염기로 하여 매긴 번호를 말하며 Table 2의 extension primer를 통해 위치를 파악할 수 있다; Genbank X52425)으로 C/C가 정상이나 환자군에서 총 3명

이 C/A로 나타났으며 ter2301에서도 같은 현상이 나타나 2가지를 추가하였다. Q576R의 302번째 자리에서 다른 모든 사람은 G/G이나 1명뿐인 정상인이 G/A로 나타나 이것 역시 추가하여 실험하기로 결정하였다.

Mitsuyas 등이 밝힌 I75V [15]는 본 실험에서 염기서열 분석 결과 A/A인 사람은 총 10명(정상 1명, 과거 보유자 3명, 현재 보유자 6명)중 1명으로 현재 알려지 보유자였다. A/G로 hetero인 사람은 총 6명으로 과거 보유자와 정상인이 각각 한명이었고 현재 알려지 보유자가 4명이었다. 마지막으로 G/G, 즉 두 개의 상동염색체에 모두 변이가 일어난 사람은 총 3명으로 한명이 과거 보유자, 두 명이 현재 보유자였다 (Table 3). HG는 Fig. 2A의 ter 부분 염기서열 분석 과정 중에 새롭게 찾은 것으로 총 9명(정상 1명, 보유자 3명, 환자 6명) 중 정상 1명만 G/A hetero로 나타났으며 나머지는 모두 G/G로 나타났다. Hershey 등이 밝힌 Q576R [9]은 총 9명중 현재 알려지 보유자 1명만 T/C hetero로 나타났으며 나머지는 모두 T/T로 정상이었다. Takabayashi 등이 밝힌 -34C/T [21]는 총 8명 (정상 1명, 과거 보유자 3명, 현재 보유자 4명) 중 5명 T/T였으며 그 중 1명이 과거 보유자, 4명은 현재 보유자였다. C/T인 사람은 총 3명으로 1명이 정상, 2명은 과거 보유자였다. Noguchi 등이 밝힌 -590C/T [16]는 염기서열을 분석한 모든 사람에서 C/C homo로 나타났다. 위에서 언급한 ter2236은 총 10명 (정상 1명, 과거 보유자 3명, 현재 보유자 6명)중 현재 보유자 3명이 C/A hetero로 나타났다. 또한 ter2301도 염기서열 분석 결과, 총 10명 중 현재 보유자 3명이 C/A hetero로 나타났다(Table 3).

Mass spectrometric genotyping 결과

P value는 통계에 적용하는 샘플의 수를 고려하여 Fisher's exact test를 통해 구했다. major, minor allele을 가지고 P value (additive)를 구했으며 allergic group (환자군)에서 frequency가 큰 allele이 우성일 때와 열성일 때로 나누어 P value를 구했고, 각각 dominant, recessive라고 표기했다. 그리고 P value외에도 통계적으로 의미 있는 결과를 탐색하기 위해 Oderation 처리 방법도 사용했다.

I75V의 통계처리 결과(Table 4) allergic group (현재, 과거 보유자 포함)과 nonallergic control (이하 control로 칭함)에서 G/G의 비율이 각각 23.7%(38명중 9명), 12.5%(48명중 6명)로 차이가 컸지만 G frequency는 0.03으로 작은 차이를 보였다. 그러나 allergic group 을 병명에 따라 범위를 좁혀 G frequency를 조사하자 아토피 0.55, 비염 0.53에 비해 천식은 0.75로 의미 있게 높은 수치를 나타내었다. 이를 통해 I75V는 천식에 영향을 미칠 것이라는 결론을 내릴 수 있다. 이는 I75V가 천식과 관련이 있다는 보고와도 일치 한다[15].

Q576R의 통계처리결과(Table 4) C frequency가 allergic group에서 0.06 높게 나타났고, T/C의 퍼센트 비율도 3.9%

Table 3. SNP analysis using sequencing analysis

	total	homo (F/F)			hetero (F/B)			homo (B/B)		
		norm	past	pres	norm	past	pres	norm	past	pres
I75V (A/G)	10			1	1	1	4		1	2
HG (G/A)	9		3	5	1					
Q576R (T/C)	9	1	2	5			1			
-34C/T	8				1	2			1	4
-590C/T	9	1	3	5						
S727A (T/G)	10	1	3	6						
ter2236 (C/A)	10	1	3	3			3			
ter2301 (C/A)	10	1	3	3			3			

homo (F/F) is homologous nucleotide pair with the former nucleotides in the parenthesis of the left SNPs, hetero (F/B) is heterologous nucleotide pair, and homo (B/B) is also homologous nucleotide pair with the latter nucleotides. For example, homo (F/F) of I75V (A/G) is A/A, whereas homo (B/B) is G/G.

norm: normal person for allergy

past: person who had allergy in the past

pres: person having allergy at present

Table 4. Statistical analysis of I75V and Q576R

SNP	I75V			Q576R		
Allergic group						
Number	A/A 13	A/G 16	G/G 9	T/T 18	T/C 9	C/C 1
Alleles	A	G		T	C	
Number	42	34		45	11	
Allele frequency	0.55	0.45		0.80	0.20	
Nonallergic control						
Number	A/A 14	A/G 28	G/G 6	T/T 28	T/C 11	C/C 0
Alleles	A	G		T	C	
Number	56	40		67	11	
Allele frequency	0.58	0.42		0.86	0.14	
P value	add 0.64	dom 0.65	rec 0.81	add 0.48	dom 0.58	rec 0.41
Oderation	0.88	0.79	2.20	1.45	1.41	none

※ add: additive, dom : dominant, rec: recessive

(알러지 그룹 28명중 9명, 32.1%; 정상 그룹 39명중 11명 28.2%) 높았다. 또한 control의 샘플수가 allergic group보다 많음에도 불구하고 allergic group에서만 C/C가 나타난 것을 보아 C/C homo인 경우에만 알러지에 영향을 준다는 가설을 세울 수 있다.

-34C/T의 통계 처리 결과(Table 5) allergic group과 control 사이에 frequency 차이가 없었다. Oderation 결과 additive, dominant, recessive 세 가지 모두 1에 근접한 것을 보아, -34C/T가 한국인에게도 적용되는 SNP인지는 알 수가 없다.

-590C/T의 통계처리 결과(Table 5) T frequency가 에서 오히려 높았다. T/T의 비율도 정상 그룹에서 16.7% 더 높아 (알러지 그룹 32명중 11명, 34.4%; 정상 그룹 43명중 22명

51.1%) -590C/T 역시 한국인의 알러지와 큰 연관성은 없다고 판단된다. -590C/T의 연구들은 서로 다른 결과를 보고[8, 16,20,21,23) 하는 경우가 많은데 이는 각 연구들이 서로 다른 인종을 대상으로 했기 때문으로 여겨진다. 이 사항을 더 심도 있게 연구하려면, 더 많은 샘플을 확보하여 haplotype 연구를 해보아야 한다.

S727A는 (Table 5) 모든 샘플에서 공통적으로 T/T (ser/ser)만 관찰되었다. G (ala) frequency가 매우 작다는 보고 (17)가 있으며 우리가 조사하는 그룹에서는 G allele이 없는 것으로 판단했다.

ter2301, ter2236은 실험 결과 모든 샘플이 G/G가 나왔다. 염기서열 분석결과 둘 다 C/G가 나온 샘플도 G/G가 나왔

Table 5. Statistical analysis of -34C/T, -590C/T and S727A

SNP	-34C/T			-590C/T			S727A		
Allergic group									
Number	C/C 2	C/T 8	T/T 19	C/C 3	C/T 18	T/T 11	G/G 0	G/T 0	T/T 40
Alleles	C	T		C	T		G	T	
Number	12	46		24	40		0	8	
Allele frequency	0.20	0.80		0.38	0.62		0.00	1.00	
Nonallergic control									
Number	C/C 3	C/T 10	T/T 26	C/C 6	C/T 15	T/T 22	GG 0	GT 0	TT 50
Alleles	C	T		C	T		G	T	
Number	16	62		27	59		0	100	
Allele frequency	0.20	0.80		0.31	0.69		0.00	1.00	
	add	dom	rec	add	dom	rec	add	dom	rec
P value	1.00	1.00	1.00	0.49	0.15	0.73	1.00	1.00	1.00
Oderation	0.99	0.89	1.05	0.76	2.00	0.64	none	none	none

다. 두 실험의 원리를 비교해본 결과 mass spectrometric genotyping이 더 신뢰할 만하다는 결론을 얻었다. ter2301, ter2236에 대해 C/G가 나온 샘플을 다시 거꾸로 염기서열 분석하자 G/G가 나온 것은 이 결론을 확실하게 해주었다. 결국 이 control과 allergic group에서 염기서열의 차이가 없다는 것일 뿐만 아니라 변이가 전혀 일어나지 않았다는 것이므로 이 2가지는 SNP라 할 수 없다.

IL-4Ra의 I75V와 Q576R은 V/R combination일 경우 IL-4에 더 민감하게 반응하는 IL-4Ra를 발현시킨다는 보고가 있다[18]. 이것을 토대로 우리가 보유한 SNP 샘플들 중에서 I75V와 Q576R의 genotyping 결과를 모두 가진 샘플을 대상으로 이 두 SNP의 allele 조합을 분석하였다(allergic group : 27개, control : 37개). 그 결과 allergic group에서는 총 27개의 샘플 중 8개(29.6%)에서, control에서는 총 37개의 샘플 중 10개(26%)에서 적어도 하나의 V/R combination을 가졌다(즉, allergic group에서 control에 비해 3.6% 높은 비율로 I75V, Q576R에 대해서 각각 적어도 하나의 변이를 일으켰다).

본 연구는 알러지의 유전적 요인을 찾기 위해 알러지와 연관이 있는 SNP를 조사 하였다. 알러지를 유발하는데 관여하는 IL-4와 IL-4Ra를 중심으로 기존에 여러 논문을 통해 발표된 알러지와 연관이 있는 SNP를 찾아 이들을 종합적으로 분석하고자 하였다. 실험 대상으로는 과학영재학교에 있는 학생들을 상대로 하였다. 설문 조사결과 이들의 30% 가량이 현재 알러지를 가지고 있었으며 이들이 특정 SNP를 가질 것으로 가정하였다. 그러나 기대한 것처럼 알러지를 가진 사람들이 확인한 차이로 특정 SNP를 나타내지는 않았다. 단지 약간의 연관성이 있는 것처럼 보이는 것들이 있었다. 기존의 보고들은 제한되고 형질이 분명한 그룹 안에 있는 사람들을 대상으로 genotyping을 한 반면 본 연구에서는 조사 대상이 임의의 그룹이며 또한 형질이 분명하지 않다는 한계가 있었

다. 현재 국내에서 많은 회사들이 임의의 사람들을 대상으로 유전자 검사를 통해 질병 및 성향을 예측하는 서비스를 하고 있다. 본 연구를 통해 복합적인 유전자의 영향에 의해 나타나는 질환 또는 성향을 단편적인 유전자 검사를 통해 예측하는 것이 무리가 있음을 보여준다.

요 약

알러지는 복합적인 유전적, 환경적 요인에 의해 발병하는 질환이다. 선진국에서 알러지 질환의 수가 증가함에 따라 알러지에 대한 관심이 증가하고 있으며 이에 대한 유전적인 원인에 대한 관심도 증가하고 있다. 알러지에는 천식, 아토피, 비염을 포함한 알러지에 관련된 유전자와 염색체 부위가 밝혀지고 있다. 하지만 이들에 대한 평가 및 확인이 제대로 진행되지 않는 상황이다. 본 연구팀은 알러지를 일으키는 유전적 요인을 찾고자 하였다. 과학영재학교 138명을 대상으로 하였고 이들 중 약 30%가 천식, 아토피, 비염과 같은 알러지 질환을 앓고 있었다. 본 연구팀은 지금까지 보고된 연구 결과들을 토대로 알러지에 관련된 유전자를 찾았으며 그중 알러지를 일으키는데 관여하는 IL-4와 IL-4Ra를 후보 유전자로 선정하였다. 지금까지 발표된 보고들은 SNP의 발견과 그리고 하나 혹은 두개의 SNP에 초점을 맞추어 발표한 반면, 본 연구팀은 알러지와 관련하여 발표된 IL-4와 IL-4Ra의 SNP를 종합적으로 분석하고자 하였다. 과학영재학교 학생들 96명을 머리카락 샘플을 확보하고 이것으로 9개의 SNP를 선정하여 염기서열 분석 및 MALDI-TOF을 이용한 유전자 분석을 진행하였다. 각각의 SNP에 대해 알러지를 가지고 있는 그룹과 정상 그룹간의 약간의 차이들은 있었지만 이것이 알러지를 가지고 있는 사람과 정상인과의 구분을 시켜줄 수 있을 정도는 아니었다. 이러한 결과는 현재 한국에서 널리 행하여

지고 있는 유전자 검사에 대한 재고가 필요함을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2003년도 과학기술부의 R&E 사업에서 연구비 지원을 받았습니다.

참고 문헌

- Anderson, G. G., and W. O. Cookson. 1999. Recent advances in the genetics of allergy and asthma. *Mol Med Today* **5**, 264-73.
- Barnes, K. C., and D. G. Marsh. 1998. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* **19**, 325-32.
- Bleecker, E. R. 1998. Mapping susceptibility genes for asthma and allergy. *Clin Exp Allergy* **28** Suppl **5**, 6-12; discussion 26-8.
- Buetow, K. H., M. Edmonson, R. MacDonald, R. Clifford, P. Yip, J. Kelley, D. P. Little, R. Strausberg, H. Koester, C. R. Cantor, and A. Braun. 2001. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 581-4.
- Busse, W. W., and R. F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N Engl J Med* **344**, 350-62.
- Deichmann, K., J. Bardutzky, J. Forster, A. Heinzmann, and J. Kuehr. 1997. Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 696-7.
- Drazen, J. M., and S. T. Weiss. 2002. Genetics: inherit the wheeze. *Nature* **418**, 383-4.
- Elliott, K., E. Fitzpatrick, D. Hill, J. Brown, S. Adams, P. Chee, G. Stewart, D. Fulcher, M. Tang, A. Kemp, E. King, G. Varigos, M. Bahlo, and S. Forrest. 2001. The -590C/T and -34C/T interleukin-4 promoter polymorphisms are not associated with atopic eczema in childhood. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 285-7.
- Hershey, G. K., M. F. Friedrich, L. A. Esswein, M. L. Thomas, and T. A. Chatila. 1997. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* **337**, 1720-5.
- Izuhara, K., Y. Yanagihara, N. Hamasaki, T. Shirakawa, and J. M. Hopkin. 2000. Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain. *J Allergy Clin Immunol* **106**, S65-71.
- Kruse, S., T. Japha, M. Tedner, S. H. Sparholt, J. Forster, J. Kuehr, and K. A. Deichmann. 1999. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* **96**, 365-71.
- Lee, J. K., C. Park, K. Kimm, and M. S. Rutherford. 2002. Genome-wide multilocus analysis for immune-mediated complex diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 771-3.
- Lewis, D. B. 2002. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr Opin Immunol* **14**, 644-51.
- Liu, X., T. H. Beaty, P. Deindl, S. K. Huang, S. Lau, C. Sommerfeld, M. D. Fallin, W. H. Kao, U. Wahn, and R. Nickel. 2003. Associations between total Serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 382-8.
- Mitsuyasu, H., K. Izuhara, X. Q. Mao, P. S. Gao, Y. Arinobu, T. Enomoto, M. Kawai, S. Sasaki, Y. Dake, N. Hamasaki, T. Shirakawa, and J. M. Hopkin. 1998. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* **19**, 119-20.
- Noguchi, E., M. Shibasaki, T. Arinami, K. Takeda, Y. Yokouchi, T. Kawashima, H. Yanagi, A. Matsui, and H. Hamaguchi. 1998. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* **28**, 449-53.
- Ober, C., S. A. Leavitt, A. Tsalenko, T. D. Howard, D. M. Hoki, R. Daniel, D. L. Newman, X. Wu, R. Parry, L. A. Lester, J. Solway, M. Blumenthal, R. A. King, J. Xu, D. A. Meyers, E. R. Bleecker, and N. J. Cox. 2000. Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* **66**, 517-26.
- Risma, K. A., N. Wang, R. P. Andrews, C. M. Cunningham, M. B. Ericksen, J. A. Bernstein, R. Chakraborty, and G. K. Hershey. 2002. V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* **169**, 1604-10.
- Rosa-Rosa, L., N. Zimmermann, J. A. Bernstein, M. E. Rothenberg, and G. K. Khurana Hershey. 1999. The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 1008-14.
- Rosenwasser, L. J., D. J. Klemm, J. K. Dresback, H. Inamura, J. J. Mascali, M. Klinnert, and L. Borish. 1995. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* **25** Suppl **2**, 74-8, discussion 95-6.
- Takabayashi, A., K. Ihara, Y. Sasaki, K. Kusuhara, S. Nishima, and T. Hara. 1999. Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene. *J Hum Genet* **44**, 352-3.
- Van Eerdewegh, P., R. D. Little, J. Dupuis, R. G. Del Mastro, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Pandit, J. McKenny, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S. P. Manning, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Benchekroun, N. Capparell, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M. G. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K. M. Allen, A. Pedan, M. R. Danzig, S. P. Umland, R. W. Egan, F. M. Cuss, S. Rorke, J. B. Clough, J. W. Holloway, S. T. Holgate, and T. P. Keith. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness.

Nature **418**, 426-30.

23. Walley, A. J., and W. O. Cookson. 1996. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* **33**, 689-92.
24. Wjst, M., and T. Immervoll. 1998. An Internet linkage and mutation database for the complex phenotype asthma. *Bioinformatics* **14**, 827-8.