

## 한국인 자폐스펙트럼장애와 UROC1 유전자의 연관성 분석

박정원<sup>1)\*</sup> · 노명자<sup>1)\*</sup> · 남 민<sup>2)</sup> · 방희정<sup>3)</sup> · 양재원<sup>4)</sup> · 최경식<sup>5)</sup> · 김수강<sup>6)</sup> · 정주호<sup>6)</sup> · 곽규범<sup>1)</sup>

CHA의과대학 의생명대학 의생명과학교실,<sup>1)</sup> 서울특별시 시립어린이병원 정신건강의학과,<sup>2)</sup>  
이화여자대학교 사회과학대학 심리학과교실,<sup>3)</sup> 고려대학교 의과대학 정신건강의학과교실,<sup>4)</sup>  
중부대학교 사회과학대학 유아특수교육학과교실,<sup>5)</sup> 경희대학교 의과대학 고헌의학연구소<sup>6)</sup>

### No Association between Single Nucleotide Polymorphisms in Urocanase Domain Containing 1 (UROC1) and Autism Spectrum Disorders (ASDs) in the Korean Population

JungWon Park, B.S.<sup>1)\*</sup>, MyungJa Ro, B.S.<sup>1)\*</sup>, Min Nam, M.D., Ph.D.<sup>2)</sup>,  
Hee Jung Bang, Ph.D.<sup>3)</sup>, Jae Won Yang, M.D.<sup>4)</sup>, Kyung-Sik Choi, Ph.D.<sup>5)</sup>,  
Su Kang Kim, Ph.D.<sup>6)</sup>, Joo-Ho Chung, M.D., Ph.D.<sup>6)</sup> and KyuBum Kwack, Ph.D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seongnam, Korea

<sup>2)</sup>Department of Psychiatry, Seoul Metropolitan Children's Hospital, Seoul, Korea

<sup>3)</sup>Department of Psychology, College of Social Science, Ewha Womans University, Seoul, Korea

<sup>4)</sup>Department of Psychiatry, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

<sup>5)</sup>Department of Elementary Special Education, College of Social Science, Joongbu University, Geumsan, Korea

<sup>6)</sup>Kohwang Medical Research Institute, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

**Objectives** : Urocanase domain containing 1 (UROC1) has never been studied in prior studies on autism spectrum disorders (ASDs). UROC1 causes urocanic aciduria, one of the symptoms of which is mental retardation. The aim of this study was to investigate the association between the UROC1 gene and ASDs in a Korean population.

**Methods** : A total of 258 control and 214 patients with ASD were used as subjects of this study. SNPs selected from UROC1 were genotyped using Illumina Golden-Gate Genotyping assay with VeraCode<sup>®</sup> technology. Statistical analysis was performed using SAS and Plink software.

**Results** : We found no association of the 12 SNPs in the UROC1 gene with ASDs in a Korean population.

**Conclusion** : Our study suggests that the 12 SNPs (11 SNPs and 1 SNP in the intron and 3'UTR region, respectively) in the UROC1 were not associated with ASDs in a Korean population. Further study on the exon region of UROC1 is needed.

**KEY WORDS** : Autism Spectrum Disorders · UROC1 · Mental Retardation · SNP.

## 서 론

자폐스펙트럼장애(autism spectrum disorder, ASD)는 임상적, 행동학적으로 유사한 특성들을 공유하는 자폐장애, 아

스퍼져장애, 레트장애, 소아기 붕괴성 장애, 달리 분류되지 않는 전반적 발달장애로 분류된다.<sup>1)</sup> 자폐스펙트럼장애는 의사소통의 장애, 사회적 상호작용의 장애, 복잡한 신경적 요소를 가지는 뇌신경학적 발달장애이다.<sup>2)</sup>

지난 10년간 자폐스펙트럼장애의 세계적 유병률은 1000명당 4명에서 1000명당 6명으로 증가하였다.<sup>3)</sup> 최근 7세에서 12세의 특정지역에 거주하는 한국인 학생집단을 대상으로 한 연구에서 자폐스펙트럼장애의 유병률이 2.64%로 높게 보고되었다.<sup>4)</sup> 자폐스펙트럼장애의 원인은 많은 연구에도 불구하고 분명히 밝혀지지 않았지만 기질적 요인, 생화학적 요인, 유전적 요인 등이 제시되고 있다. 특히 자폐스펙트럼장애의 유전

접수완료 : 2011년 10월 17일 / 심사완료 : 2011년 12월 15일

Address for correspondence: KyuBum Kwack, Ph.D., Department of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, 43 Beolmal-ro 43 beon-gil, Bundang-gu, Seongnam 463-836, Korea

Tel : +82.31-725-8376, Fax : +82.31-725-8350

E-mail : kkwack@cha.ac.kr, kkwack@gmail.com

\*These authors contribute equally.

본 연구는 보건복지부(A040002, A080734)과제의 지원으로 수행되어짐.



2. DNA 추출

게놈 DNA를 준비하기 위해서 연구대상자로부터 혈액을 채취하였다. G-DEX™ blood gDNA purification kits(Intron Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 준비된 게놈 DNA는 GoldenGate assay를 수행하기 위해서 Quant-iT™ Picogreen® dsDNA assay kit(Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 사용하여 농도를 측정하고 50ng/uL로 농도를 조절하였다.

3. 단일염기다형성 선정 및 유전형 검사

단일염기다형성 선정은 전장유전체분석(genome wide association study)과 다단계 접근방법(multi-stage approach)으로 진행하였다.<sup>12)</sup> 1단계로 Infinium 100K chip(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)으로 대조군 35명과 자폐스펙트럼장애 24명을 대상으로 연구를 수행하였다. 2단계는 Infinium II HumanExon510S-Duo chip(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)으로 대조군 188명과 자폐스펙트럼장애 44명을 대상으로 2단계 연구를 수행하였다. 1단계와 2단계에서 유의하게 나온 UROC1 유전자의 단일염기다형성에 미국 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 dbSNP

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)에 등록되어 있는 UROC1 유전자의 단일염기다형성을 추가하여 3단계 실험에 사용할 단일염기다형성으로 선정하였다. 선정된 단일염기다형성들은 Golden-Gate 96plex Genotyping assay for VeraCode(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 표준 프로토콜에 따라서 유전형 검사를 진행하였다. 얻어진 형광값들은 Genome Studio Software(V2010., Genotyping version 1.8.4, Illumina Inc., San Diego, CA, USA)로 군집화(clustering)를 하여 유전형을 결정하였다.

4. 통계분석

환자군과 대조군의 유전형의 분포가 Hardy-Weinberg equilibrium(HWE)을 만족하는지, 유전형의 결정에 오류 유무를 확인하기 위해서 카이제곱검정을 실시하였다. 각각의 단일염기다형성은 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency)가 0.01 이상이면서, 카이제곱검정의 유의수준(p-value)이 .05 이상인 단일염기다형성을 선택하였다. 유전형 질병 연관성 분석을 위해서 환자군과 대조군 간의 유의성 검사를 대립인자의 경우, 카이제곱검정을 통해 수행하였다. 유전형의 경우, 유전모형별 유의성 검사를 위해 유전모형별로 유전형 빈도

Table 1. Allele frequency and allele analysis of UROC1 polymorphisms between ADSs and controls

SNP	Allele	ASD (%)	Control (%)	CHISQ	p-value	OR (95% CI)	Location
rs777486	A	114 (26.76)	125 (24.32)	0.7323	.3921	1.137 (0.8472-1.526)	INTRON
	G	312 (73.24)	389 (75.68)				
rs1168594	A	140 (32.71)	162 (31.52)	0.1525	.6961	1.056 (0.8026-1.39)	INTRON
	T	288 (67.29)	352 (68.48)				
rs777488	G	140 (32.71)	160 (31.37)	0.1914	.6617	1.063 (0.8075-1.4)	INTRON
	A	288 (67.29)	350 (68.63)				
rs777490	A	140 (32.71)	162 (31.52)	0.1525	.6961	1.056 (0.8026-1.39)	INTRON
	G	288 (67.29)	352 (68.48)				
rs1873388	A	140 (32.86)	166 (32.3)	0.03424	.8532	1.026 (0.7803-1.35)	INTRON
	G	286 (67.14)	348 (67.7)				
rs4679251	G	189 (0.4416)	229 (44.73)	0.03042	.8615	0.9773 (0.7548-1.265)	INTRON
	A	239 (55.84)	283 (55.27)				
rs4383463	A	190 (44.39)	223 (43.22)	0.1314	.717	1.049 (0.8102-1.358)	INTRON
	G	238 (55.61)	293 (56.78)				
rs6797423	G	97 (23.21)	135 (27.33)	2.028	.1544	0.8036 (0.5946-1.086)	INTRON
	A	321 (76.79)	359 (46.51)				
rs708907	G	195 (45.77)	134 (46.51)	0.05099	.8213	0.9708 (0.7505-1.256)	INTRON
	A	231 (54.23)	276 (53.49)				
rs777479	A	177 (41.75)	221 (43.16)	0.191	.6621	0.9436 (0.7272-1.224)	INTRON
	C	247 (58.25)	291 (56.84)				
rs1799387	A	208 (48.83)	257 (50.99)	0.4332	.5104	0.917 (0.7084-1.187)	INTRON
	G	218 (51.17)	247 (49.01)				
rs777513	A	192 (44.86)	223 (43.39)	0.206	.6499	1.062 (0.82-1.375)	3' UTR
	T	236 (55.14)	291 (56.61)				

ASD : autism spectrum disorders, CHISQ : chi square, CI : confidence interval, OR : odds ratio

**Table 2.** Genotype distribution and association analysis for genetic model by logistic regression for SNPs within UROC1

SNP	Genotype	Frequency		Additive		Dominant		Recessive	
		ASD	Control	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
rs777486	GG	111	157						
	GA	90	75	1.127 (0.8483–1.498)	.4093	1.443 (0.9989–2.084)	.051	0.554 (0.2714–1.131)	.105
	AA	12	25						
rs1168594	TT	100	126						
	TA	88	100	1.052 (0.8079–1.369)	.7076	1.096 (0.7625–1.577)	.619	1.008 (0.5782–1.758)	.977
	AA	26	31						
rs777488	AA	100	125						
	AG	88	100	1.059 (0.8121–1.38)	.6736	1.096 (0.7618–1.577)	.621	1.037 (0.5926–1.815)	.898
	GG	26	30						
rs777490	GG	100	126						
	GA	88	100	1.052 (0.8079–1.369)	.7076	1.096 (0.7625–1.577)	.619	1.008 (0.5782–1.758)	.977
	AA	26	31						
rs1873388	GG	99	123						
	GA	88	102	1.024 (0.7868–1.333)	.8586	1.057 (0.7346–1.521)	.765	0.9776 (0.5625–1.699)	.936
	AA	26	32						
rs4679251	AA	63	81						
	AG	113	121	0.9771 (0.7538–1.266)	.861	1.109 (0.7476–1.646)	.606	0.8077 (0.509–1.281)	.364
	GG	38	54						
rs4383463	GG	65	81						
	GA	108	131	1.05 (0.8082–1.365)	.7131	1.049 (0.7085–1.553)	.811	1.092 (0.6851–1.741)	.711
	AA	41	46						
rs6797423	AA	127	130						
	AG	67	99	0.81 (0.6023–1.089)	.1634	0.7174 (0.4938–1.042)	.081	0.9837 (0.4829–2.004)	.964
	GG	15	18						
rs708907	AA	58	76						
	AG	115	124	0.9702 (0.7479–1.258)	.8195	1.116 (0.7456–1.67)	.594	0.7973 (0.5077–1.252)	.325
	GG	40	58						
rs777479	CC	70	87						
	CA	107	117	0.9447 (0.73–1.223)	.6654	1.044 (0.71–1.536)	.826	0.7757 (0.4832–1.245)	.293
	AA	35	52						
rs1799387	GG	58	65						
	GA	102	117	0.9213 (0.7168–1.184)	.5224	0.9289 (0.6146–1.404)	.727	0.8613 (0.5685–1.305)	.481
	AA	53	70						
rs777513	TT	61	86						
	TA	114	119	1.062 (0.8197–1.376)	.6494	1.261 (0.8507–1.871)	.248	0.8786 (0.5537–1.394)	.583
	AA	39	52						

ASD : autism spectrum disorders, CI : confidence interval, OR : odds ratio

**Table 3.** Haplotype association analysis of each haplotype in UROC1

Gene	Block	Haplotype	Frequency	ASD (%)	Control (%)	CHISQ	p-value
UROC1	Block1	GC	0.5	219 (51.1)	251 (49.1)	0.39	.5321
		AA	0.425	179 (41.8)	221 (43.2)	0.19	.6629
		AC	0.075	30 ( 7.1)	40 ( 7.7)	0.136	.7123
	Block2	GGATG	0.671	256 (66.8)	345 (67.4)	0.034	.8528
		AAGAA	0.249	112 (26.1)	122 (23.8)	0.68	.4097
		AAGAG	0.073	28 ( 6.6)	40 ( 7.8)	0.554	.4568

ASD : autism spectrum disorders, CHISQ : chi square

를 재구성하였다. 각 유전모형은 우성(dominant, AA vs. AB+BB), 열성(recessive, AA+AB vs. BB), 공우성(additive, AA vs. AB vs. BB)으로 나누었다. 각각의 유전모형은 로지스틱 회귀분석을 통해서 상대적 위험도(odds ratio, OR)와 95%신뢰구간 및 유의수준을 산출하였다. 연관비평형(linkage disequilibrium, LD)은 Haploview software(version 4.2, <http://www.broadinstitute.org/haploview>)를 이용하여 확인하였다. 연관비평형 블록은 Gabriel 등이 제시한 알고리즘<sup>13)</sup>을 사용하였다. 이로부터 얻어진 반수체형(Haplotype)은 카이제곱검정을 통해서 질병연관성 분석을 하였다.

통계분석은 Plink(version 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) & gPlink(version 2.050, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/gplink.shtml>)와 SAS(version 9.1.3 Service Pack 4)를 이용하여 수행하였다.

## 결 과

자페스펙트럼장애와 UROC1 유전자의 연관성을 확인하기 위해서, 유전자 내의 단일염기다형성에 대해서 유전형 검사를 실시하였다. 13개의 단일염기다형성 중 1개의 단일염기다형성이 군집화(clustering)가 불가능하여 유전자형을 알 수 없었다. 12개의 단일염기다형성은 intron에 11개, 3'UTR에 1개가 존재한다(Fig. 1). 모든 단일염기다형성의 유전형 분포는 Hardy-Weinberg distribution를 따른다( $p > .05$ ). 대립인자 분석에서 각 단일염기다형성은 환자군과 대조군 간의 유의한 차이가 없음을 확인하였다( $p\text{-value} > .05$ )(Table 1).

유전형 연관분석을 로지스틱 회귀분석을 통해 확인한 결과, 모든 유전 모델에서 유의한 결과를 나타내지 않았다( $p\text{-value} > .05$ )(Table 2).

Haploview 프로그램을 이용하여 Gabriel의 알고리즘에 따라 단일염기다형성 간의 연관비평형 블록의 구조를 확인한 결과, UROC1 유전자의 12개의 단일염기다형성이 2개의 블록으로 나누어져서 연관비평형 블록을 형성함을 확인하였다(Fig. 1). 반수체형 분석결과, 2개의 블록의 모든 반수체형에서 모두 유의성이 없었다( $p\text{-value} > .05$ )(Table 3).

## 고 찰

본 연구는 전장유전체 분석방법을 이용한 환자-대조군 연관성 분석 연구로, 대립인자 분석과 유전형 분석, 반수체형 분석 모두에서 UROC1 유전자의 단일염기다형성과 자페스펙트럼장애와의 유의한 연관성을 발견하지 못하였다.

Urocanic aciduria는 상염색체 열성 대사장애(autosomal

recessive metabolic disorder)로서, 정신지체(mental retardation)와 간헐적인 운동실조증(intermittent ataxia) 등의 증상을 보인다.<sup>9,14)</sup> 이러한 증상의 원인은 urocanase 결함과 독성 대사산물(toxic metabolites)의 축적(accumulation)일 것이라는 보고가 있다.<sup>15)</sup> 최근 urocanic aciduria 환자에서 UROC1 유전자의 c.209T->C(exon 2)과 c.1348C->T(exon 14)의 변이를 발견하였고, 아미노산 번역과정에서 각각 p.L70P와 p.R450C로 치환된다. R450의 아르기닌(arginine)이 시스테인(cysteine)로 치환되면, urocanase는 urocanate와 결합하지 않는다. 이러한 UROC1에서의 변이가 urocanic aciduria의 원인이라는 보고가 있다.<sup>9)</sup> Glutamate formiminotransferase deficiency는 히스티딘 대사과정에서 생기는 또 다른 물질대사 결함으로서, 이 질병을 가지는 환자에서 또한 정신지체 및 신체 발달지연을 가진다.<sup>7)</sup> 이는 urocanic acid의 이화작용이 제대로 수행되지 않으면 정신지체의 유발에 영향을 미친다고 볼 수 있다.

본 연구는 UROC1 유전자와 자페스펙트럼장애와의 연관성에 대한 최초의 연구로서 중요한 실험적 보고자료가 될 것이다. UROC1 유전자의 exon 영역의 변이가 자페스펙트럼장애와 연관성을 가지는지 본 연구에서는 진행되지 않았다. 하지만 urocanic aciduria의 연구를 바탕으로 사료한 결과, 본 연구자들은 UROC1 유전자의 기능에 영향을 미치는 변이가 정신지체 증상을 유발하여 자페스펙트럼장애 발병에 영향을 미칠 것이라 추측한다. 따라서, UROC1유전자의 변이와 자페스펙트럼장애와의 명확한 연관성을 알기 위해서는 추후 UROC1 유전자의 exon부위에 위치한 단일염기다형성 그리고 urocanic acid의 대사과정과 자페스펙트럼장애와의 연관성 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

한국인에서 자페스펙트럼장애와 UROC1 유전자의 intron 영역 및 3'UTR영역에 존재하는 단일염기다형성 간의 유의한 상관관계를 찾지 못하였다. UROC1유전자의 변이와 자페스펙트럼장애와의 명확한 연관성을 알기 위해서 UROC1 유전자의 exon영역에 대한 연관성 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**중심 단어:** 자페스펙트럼장애 · UROC1 · 단일염기다형성 · 연관성 분석.

## References

- 1) Casanova MF. The neuropathology of autism. Brain Pathol 2007; 17:422-433.
- 2) Veenstra-VanderWeele J, Cook EH Jr. Molecular genetics of autism

- spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 2004;9:819-832.
- 3) **Faras H, Al Ateeqi N, Tidmarsh L.** Autism spectrum disorders. *Ann Saudi Med* 2010;30:295-300.
  - 4) **Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC, et al.** Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry* 2011;168:904-912.
  - 5) **Folstein S, Rutter M.** Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 1977;18:297-321.
  - 6) **Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al.** Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 1995;25:63-77.
  - 7) **Hilton JF, Christensen KE, Watkins D, Raby BA, Renaud Y, de la Luna S, et al.** The molecular basis of glutamate formiminotransferase deficiency. *Hum Mutat* 2003;22:67-73.
  - 8) **Yoshida T, Tada K, Honda Y, Arakawa T.** Urocanic aciduria: a defect in the urocanase activity in the liver of a mentally retarded. *Tohoku J Exp Med* 1971;104:305-312.
  - 9) **Espinós C, Pineda M, Martínez-Rubio D, Lupo V, Ormazabal A, Vilaseca MA, et al.** Mutations in the urocanase gene URO1 are associated with urocanic aciduria. *J Med Genet* 2009;46:407-411.
  - 10) **Association AP.** Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders. 4th ed. Washington: American Psychiatric Publishing, Inc.; 1994.
  - 11) **Chlebowski C, Green JA, Barton ML, Fein D.** Using the childhood autism rating scale to diagnose autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2010;40:787-799.
  - 12) **Hirschhorn JN, Daly MJ.** Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005;6:95-108.
  - 13) **Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al.** The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225-2229.
  - 14) **Imaeda M, Wada Y.** [Urocanic aciduria (urocanase deficiency)]. *Ryōikibetsu Shokogun Shirizu* 1998:150-151.
  - 15) **Kalafatic Z, Lipovac K, Jezerinac Z, Juretic D, Dumic M, Zurga B, et al.** A liver urocanase deficiency. *Metabolism* 1980;29:1013-1019.