

RORA 유전자 다형성과 한국인 젊은 성인에서 일중선호도와와의 연관성

Association of the RORA Gene Polymorphism and Diurnal Preference in a Young Korean Population

주 훈¹ · 조철현² · 문정호^{2,3} · 김 린² · 이현정^{2,3}

Hoon Ju,¹ Chul-Hyun Cho,² Jung Ho Moon,^{2,3} Leen Kim,² Heon-Jeong Lee^{2,3}

■ ABSTRACT

Objectives: The retinoid-related orphan receptor A (*RORA*) gene has been reported to have an impact on circadian rhythm regulation. In this study, we analyzed the relationship between the *RORA* gene polymorphism and diurnal preference in Korean young adults.

Methods: A population of 504 young adults was included in the study. All subjects were given and completed a 13-item composite scale for morningness (CSM). The *RORA* gene rs11071547 single-nucleotide polymorphism (SNP) was genotyped by PCR-based methods.

Results: CSM score was not associated with genotype or allele carrier status of the *RORA* rs11071547 SNP.

Conclusion: This result indicates that the *RORA* rs11071547 SNP does not play a role in diurnal preference. **Sleep Medicine and Psychophysiology 2016 ; 23(1) : 25-28**

Key words: Diurnal preference · Polymorphism · *RORA* · Morningness.

서 론

일중선호도(diurnal preference)는 한 개인이 아침 또는 저녁 중 언제 좀더 활동성과 수행능력이 좋아지는 가를 나타내는 것이며, 시간형(chronotype) 또는 아침형/저녁형(morningness/eveningness)이라고도 불린다. 아침형 인간은 보통

아침에 일찍 일어나며, 아침시간에 각성도가 증가되며 생산성이 높다. 이에 반하여 저녁형 인간은 늦게 자고 늦게 깨며, 저녁시간에 활동적이고 생산성이 높아진다. 일반적으로 일중선호도는 자기 보고식 설문지에 의하여 평가되게 된다(Adan 등 2012).

일중선호도는 개인의 내적 일주기리듬(circadian rhythm)의 영향을 받을 것이라고 여겨진다. 지금까지의 유전학 연구 결과들은 분자생물학적인 기전들이 일주기리듬을 조절한다는 것이 확립이 되어있으며, 이러한 일주기리듬은 전시상하부(anterior hypothalamus)의 시상교차상핵(suprachiasmatic nuclei : SCN)에서 조절되며 이곳을 생물학적 시계라고 부른다(Liu 등 2007). SCN의 분자생물학적인 기전은 생체시계 유전자들의 전사-번역 되먹임(transcriptional-translational feedback)을 통하여 이루어지며, 이 과정을 통하여 약 24시간의 생물학적 리듬이 만들어지게 된다(Takahashi 등 2008).

전사인자(transcription factor)인 CLOCK 또는 NPAS2와 ARNTL의 복합체가 Period (*PER*) 유전자와 Cryptochrome (*CRY*) 유전자의 전사를 활성화한다. 생성된 *PER*와 *CRY* 단백질은 복합체를 형성하여 핵 안으로 이동하고 CLOCK-ARNTL 또는 NPAS2-ARNTL과 결합하여 유전자의 전사

Received: June 7, 2016 / Revised: June 23, 2016

Accepted: June 23, 2016

본 연구는 보건복지부의 Korea Health 21 R&D Project 연구기금에 의하여 이루어졌음(HM14C2606).

¹고려대학교 의학전문대학원 의학과

Department of Medicine, Korea University School of Medicine, Seoul, Korea

²고려대학교 의과대학 정신건강의학과

Department of Psychiatry, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

³고려대학교 의과대학 대학원 의과학과

Department of Medical Science, Graduate School, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Corresponding author: Heon-Jeong Lee, Department of Psychiatry, Korea University College of Medicine, Anam Hospital, 73 Incheon-ro, Seongbuk-gu, Seoul 02841, Korea
Tel: (02) 920-6721, Fax: (02) 929-7679

E-mail: leehjeong@korea.ac.kr

를 차단하는 부적 되먹임 회로(negative feedback loop)을 형성한다. 이러한 정적, 부적 되먹임 회로가 내부 시간의 안정성을 조절하는데 기여하는 것으로 알려져 있다. 또한 또 다른 되먹임 회로가 존재하는데, CLOCK-ARNTL 복합체가 REV-ERB (*NR1D1*, *NR1D2*)와 Retinoid-related orphan receptors (*RORs*)의 전사를 활성화하고 생성된 REV-ERB와 *RORs* (*RORA*, *RORB*, *RORC*)는 *ARNTL* 유전자의 촉진염기 서열에 경쟁적으로 결합하여 REV-ERB는 *ARNTL*의 전사를 억제하고 *RORs*는 *ARNTL*의 전사를 활성화한다(Takahashi 등 2008).

개인의 일중선호도는 유전적인 요인이 크다는 것이 잘 알려져 있으며 시간유전자의 영향에 대한 보고가 많이 있다. 최근에도 여러 시간유전자들과 일중선호도의 연관성에 관한 연구들이 시행되고 있으나, 아직은 *RORA* 유전자 다형성과 일중선호도의 연관성에 관한 보고는 없었다. 본 연구에서 *RORA* 유전자 단일염기다형성(SNP) 중 rs11071547을 후보 유전자로 선정하였는데, 그 이유는 과거 연구에서 이 SNP가 수면잠복기와 연관있다는 결과를 얻었기 때문이다(Kripke 등 2015). 저자들은 유전적으로 비교적 동질적인 한국인 젊은 성인에서 *RORA* 유전자의 다형성과 일중선호도의 연관성을 살펴보고자 하였다.

Chain Reaction System (BioRad, Hercules, CA)에서 reaction 당 volume 20 μ L에서 수행되어졌다. Reaction mixture는 1.5 μ L genomic DNA, 각 primer 200 μ m [정방향시발체 : 5'-TGC CTA CCG CTT TCC TTT-3', 역방향 시발체 : 5'-AAA TAA ACT TGG AGT GTT CTG GA-3'], 1 \times Sso Fast Eva Green Super Mix(Bio-Rad), 그리고 증류수가 포함되었다. 증폭 protocol은 98 $^{\circ}$ C/3 min 시작하여 이후 98 $^{\circ}$ C/10 s와 58 $^{\circ}$ C/20 s 39 cycle하였다. 95 $^{\circ}$ C/10 s와 65 $^{\circ}$ C/10 s로 시작한 후 melting curve는 65에서 95 $^{\circ}$ C까지 온도가 cycle 당 0.3 $^{\circ}$ C씩 증가하면서 수행되었다. Melting profile은 Bio-Rad Precision Melt Software를 통해 분석되었다.

3. 일중선호도 평가

일중선호도는 Smith 등이 기술한 13문항으로 구성된 Composite Scale for Morningness (CSM) 설문지로 측정하였다(Smith 등 1989). CSM은 Horne과 Ostberg가 개발한 Morningness-Eveningness Questionnaire 만큼 신뢰성과 타당성이 갖춰진 것으로 평가되며 길이는 더 짧다(Greenwood 1994). Randler와 Diaz-Morales이 대규모 대학생들에서 시행한 연구에서 세가지 하위척도를 나누었으며 이를 '아침형(morningness : 1, 3, 6, 8, 10, 11번 항목)', '활동계획(activity plan : 2, 7, 9, 13번 항목)', '아침의 각성도(morning alertness : 4, 5, 12번 항목)'로 명명하였다(Randler 등 2007). 13개 항목들 중에, 3가지 항목은 5점 척도이며 나머지 10가지 항목들은 4점 척도로 평가하여 총점은 13에서 55점이다. 점수가 높을수록 아침형이며 낮을수록 저녁형에 해당된다. 자원자들은 한국 어판 CSM 설문지로 평가되었고 이 척도의 신뢰도는 윤진상 등에 의해서 입증된 바 있다(Yoon 등 1997).

4. 통계분석

Hardy-Weinberg 평형여부는 Chi-square test를 통해서 검증되었다. 유전자형과 대립유전자가 CSM 평균점수와 세가지 하위 척도들(아침형, 활동계획, 아침의 각성도)에 미치는 영향을 보기 위하여 성별을 공변인(covariate)으로 설정하여 analysis of covariance (ANCOVA)를 사용하여 분석하였다. 대립유전자 보유여부에 따른 분석은 t-test를 사용하였다. 양측 검정으로 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였고 통계 프로그램은 SPSS for Windows를 이용하였다.

연구결과

최종적으로 *RORA* rs11071547 유전자형이 판별된 504명의 대상이 분석에 포함되었다. *RORA* 유전자형의 분포는

연구방법

1. 연구대상

연구대상은 인터넷 광고를 통해 모집하였으며 18~35세의 507명이 참여하였다. 연구참여 전에 연구목적을 설명하고 사전동의를 구하였으며 동의서를 받았다. 대상자 본인과의 인터뷰를 통하여 주요 신체적, 정신적 질환이 없는 경우와 1차 친족에 주요 정신과 질환의 가족력이 없는 경우에 참여시켰다. Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.)를 이용하여 과거 혹은 현재 정신과적 질환에 이환 되어 있는 사람은 제외하였다. 모든 참가자로 하여금 연구의 취지를 설명하고 서면 동의를 받았으며, 고려대학교 안암병원의 기관심 의위원회의 심사와 허가를 얻었다. 본 연구에 포함된 연구대상은 과거에 시행된 유전학 연구에서도 분석되어 논문으로 발표된 바 있다(Kim 등 2013 ; Kim 등 2015).

2. 유전자형 검사

피험자로부터 5~10 mL의 정맥혈을 채취하여 EDTA 시험관에 보관하였으며, QIAamp Blood Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 백혈구의 genomic DNA를 분리하였다. 증합효소 연쇄반응은 96-well BioRad CFX 96 Real time Polymerase

Table 1. The composite scale for morningness scores in subject groups according to RORA rs11071547 variants

	CSM score			
	Morningness	Morning alertness	Activity planning	Total
RORA rs11071547 genotypes				
C/C (n=68)	10.28 ± 2.59	9.65 ± 1.89	11.63 ± 2.50	31.56 ± 5.68
C/T (n=218)	10.72 ± 2.23	10.04 ± 2.46	11.73 ± 2.66	32.49 ± 6.36
T/T (n=218)	10.50 ± 2.63	9.81 ± 2.33	11.53 ± 2.66	31.84 ± 6.58
F	0.97	0.92	0.31	0.82
P	0.38	0.40	0.74	0.44
Allele carriers				
C carriers (n=286)	10.62 ± 2.32	9.94 ± 2.34	11.71 ± 2.61	32.27 ± 6.21
C non-carriers (n=218)	10.50 ± 2.63	9.81 ± 2.33	11.53 ± 2.66	31.84 ± 6.58
t	0.51	0.63	0.74	0.74
P	0.61	0.53	0.46	0.46

CSM : composite scale for morningness, RORA : Retinoid-related orphan receptor A

Hardy-Weinberg equilibrium에서 벗어나지 않았다($\chi^2 = 4.99, p = 0.29$). Table 1은 성별을 공변인으로 하여 ANCOVA에 의하여 이용하여 각 유전자형에 따른 CSM 척도 점수와 하위척도 점수가 차이를 보이는 가를 분석하였으나 유의한 차이는 발견하지 못하였다. 또한 t-test를 통하여 C 대립유전자 보유여부에 따른 CSM 척도 점수와 하위척도 점수의 차이를 조사하였으나 역시 유의한 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과는 RORA rs11071547 유전자형과 대립유전자 보유여부에 따라 일증선호도에 있어서 유의한 차이가 없었음을 보여주었다.

고 찰

본 연구 결과는 일증선호도는 RORA rs11071547 단일염기다형성과는 연관성이 없었다. 과거의 연구들에서 RORA 유전자다형성이 수면과 같은 생체리듬과 관련되었다는 연구 보고들이 있었다. 먼저 설문지로 평가한 수면시간이 RORA 유전자다형성이 연관있다는 보고가 있었다(Allebrandt 등 2013). 하지만 이 결과는 후속연구에서 재현되지 못하였다. Kripke 등은 수면장애 환자를 대상으로 시행한 연구에서 RORA rs11071547이 주관적으로 서술한 수면잠복기, 즉 잠드는데 걸리는 시간과 연관이 있다고 보고하였으며 이는 bonferroni correction 이후에도 유의한 차이를 보였다. 또한 이 SNP이 하지불안증후군과 주기성사지운동증 증상과도 유의한 경향을 보임을 확인하였으나, 이는 bonferroni correction후에는 더 이상 유의하지 않았다. Kripke 등은 RORA 유전자다형성과 하지불안증후군의 관련 경향성이 수면잠복기의 연장의 원인일 가능성을 추정하였다(Kripke 등 2015). Utge 등도 다른 수면에 관한 유전학 연구에서 RORA 유전자다형성이 자기보고에 의한 수면량과 연관있다고 보고하였

나, bonferroni correction 이후에는 그 연관성이 유의하지 않았고 GRIA3 유전자의 rs687577 SNP가 여성에서 수면량과 연관된다고 보고하였다.

저자들은 본 연구에서 RORA 유전자와 일증선호도의 연관성을 분석하였으나, RORA 유전자다형성과 일증선호도와 연관성을 발견하지는 못하였다. 하지만 다음과 같은 점을 본 연구의 제한점으로 볼 수 있겠다. 본 연구는 총 504명을 대상으로 하였으며 일증선호도와 시간유전자들의 관계를 연구한 이전의 연구에 비교 하였을 때 전체 표본 크기가 작지는 않다. 그러나 RORA이 다른 시간유전자들과 같이 작동하여 생체시계 활동의 일부로서만 기능한다며, 실제 일증선호도에 미칠 영향이 매우 제한적일 수도 있을 것이다. 만약 이에 대한 RORA의 효과가 매우 작다고 하면 이 효과를 통계적으로 잡아내기에는 부족한 표본크기일 가능성이 있다. 또한 RORA 유전자다형성중에 우리가 사용한 RORA rs11071547가 RORA이 일증선호도에 미치는 영향을 대표하지 못할 가능성이 있다. 본 연구에서 이 SNP를 후보로 선택한 이유는 수면잠복기에 연관이 있다는 이전 연구의 결과를 참조한 것인데, 수면잠복기가 생체리듬의 조절과 연관성이 적다고 하면, 이를 테면 앞서 보고에서와 같이 하지불안증후군 등과 같은 다른 요인에 의한 영향이라고 한다면, RORA의 다른 SNP들을 같이 살펴봐야 했을 가능성이 있다. 하지만, 본 연구의 장점은 비교적 큰 규모의 대상으로 시행된 연구인 점과 유전학적으로 동질성이 큰 한국인을 대상으로 시행한 점을 들 수 있겠다.

결론적으로 본 연구의 대상자들을 통해서 RORA 유전자다형성과 일증선호도의 연관성을 확인하지 못하였다. 그러므로 RORA의 일증선호도에 영향을 미치는 지 여부를 확인하기 위해서는 표본 크기를 늘리고 다른 유전자다형성을 연구에 포함시켜서 연구를 수행할 필요가 있을 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : Retinoid-related orphan receptor A (*RORA*) 유전자가 일주기리듬의 조절에 영향을 미친다는 사실이 알려져 왔다. 본 연구에서는 *RORA* 유전자다형성과 일중선호도의 연관성을 한국인 젊은 성인을 대상으로 분석하였다.

방 법 : 광고를 통해 모집한 504명의 젊은 성인이 최종적으로 대상에 포함되었다. 모든 대상은 13문항 composite scale for morningness (CSM)를 작성하였다. *RORA* rs11071547 단일염기다형성은 PCR 기반한 실험 방법을 통하여 분석하였다.

결 과 : CSM 점수결과 일중선호도는 *RORA* rs11071547 SNP의 유전자형과 대립유전자 보유여부에 따라 차이를 보이지 않았다.

결 론 : 이러한 연구결과는 *RORA* rs11071547 SNP가 일중선호도에 중요한 역할을 하지 않을 가능성을 보여준다.

중심 단어 : 일중선호도 · *RORA* · 유전자다형성 · 아침형.

REFERENCES

Adan A, Archer SN, Hidalgo MP, Di Milia L, Natale V, Randler C. Circadian typology: a comprehensive review. *Chronobiol Int* 2012;29:1153-1175.

Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, et al. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 2007;129:605-616.

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2008;9:764-775.

Kripke DF, Kline LE, Nievergelt CM, Murray SS, Shadan FF, Dawson A, et al. Genetic variants associated with sleep disorders. *Sleep Med* 2015;16:217-224.

Kim HI, So SJ, Yang HJ, Song HM, Moon JH, Yoon HK, et al. Association of the *RORA* Gene Polymorphism and Seasonal Variations in Mood and Behavior. *Sleep Med Psychophysiol* 2013; 20:63-68.

Kim HI, Lee HJ, Cho CH, Kang SG, Yoon HK, Park YM, et al. Association of *CLOCK*, *ARNTL*, and *NPAS2* gene polymorphisms and seasonal variations in mood and behavior. *Chronobiol Int* 2015;32:785-791.

Smith CS, Reilly C, Midkiff K. Evaluation of three circadian rhythm questionnaires with suggestions for an improved measure of morningness. *J Appl Psychol* 1989;74:728-738.

Greenwood KM. Long-term stability and psychometric properties of the composite scale of morningness. *Ergonomics* 1994;37: 377-383.

Randler C, Diaz-Morales JF. Morningness in German and Spanish students: a comparative study. *Eur J Person* 2007;21:419-427.

Yoon JS, Shin SM, Kook SH, Lee HY. A preliminary study on the Korean translation of composite scale (KtCS) to measure morningness eveningness. *J Korean Neuropsychiatr Assoc* 1997;36: 122-134.

Allebrandt KV, Amin N, Muller-Myhsok B, Esko T, Teder-Laving M, Azevedo RV, et al. A K(ATP) channel gene effect on sleep duration: from genome-wide association studies to function in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 2013;18:122-132.

Utge S, Kronholm E, Partonen T, Soronen P, Ollila HM, Loukola A, et al. Shared genetic background for regulation of mood and sleep: association of *GRIA3* with sleep duration in healthy Finnish women *Sleep* 2011;34:1309-1316.