

한국인에서 PGC-1 유전자의 G1444A 단일염기다형성과 미토콘드리아 DNA 및 제2형 당뇨병간의 상관관계

송지현 · 심길진 · 양송주 · 이인규¹ · 조남한² · 이기엽³ · 이홍규⁴ · 김영미³

국립보건원 생명과학부 대사영양질환과, 계명대학교 의과대학 내분비내과¹,
아주대학교 의과대학 예방의학교실², 울산대학교 의과대학 아산생명과학연구소 & 내분비내과³,
서울대학교 의과대학 내분비내과⁴

G1444A Single Nucleotide Polymorphism of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator (PGC-1) in Korean Type II Diabetic Patients

Jihyun Song, Gil-Jin Shim, Song-Ju Yang, Inkyu Lee¹, Namhan Cho²,
Ki-Up Lee³, Hong-Kyu Lee⁴ and Youngmi Kim Pak³

*Div. of Metabolic Disease, Dept. of Biomedical Sciences, NIH, Seoul, Korea,
Dept. of Internal Medicine, Dongsan Medical Center, Keimyung University, Taegu, Korea¹,
Preventive Medicine, Ajou University, School of Medicine, Suwon, Korea²,
Asan Institute for Life Sciences, School of Medicine, University of Ulsan, Seoul, Korea³,
Seoul National University, School of Medicine, Seoul, Korea⁴*

Abstract

Objective: It has been reported that mitochondrial dysfunction may cause diabetic development. Mitochondrial dysfunction would be induced by defects in mitochondrial DNA (mtDNA) or the nuclear DNA-encoded proteins required for regulation of mitochondrial biogenesis. One of the candidate diabetic susceptibility genes is peroxisome proliferation activated receptor-gamma (PPAR-gamma) coactivator-1 (PGC-1), which regulates mitochondrial biogenesis as well as functions in adipogenesis, lipid metabolism and gluconeogenesis. This study was performed to identify the genetic polymorphisms of PGC-1 and their association with diabetes mellitus and insulin-resistant related indices and mtDNA content.

Methods: The PGC-1 gene was examined in 49 type 2 diabetic patients and 46 normal controls applying PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis. The Gly482Ser variant among the identified 4 variants were further genotyped by PCR-RFLP using MspI in 133 offsprings of diabetic patients and 161 gestational diabetic patients. The mtDNA contents of all samples were quantified by real time PCR. The statistical

책임저자 : 김영미

서울시 송파구 풍납동 388-1번지, 울산대학교 아산생명과학연구소

Tel: 02)3010-4191, Fax: 02)3010-4192, E-mail: ymkimpak@amc.seoul.kr

* 이 연구는 국립보건원 생명과학부 시험연구비, 보건의료기술 단독기초연구 (01-PJ1-PG3-20500-0147) 및 울산대학교 아산 생명과학연구소 신진교수 연구비로부터 지원받은 과제임.

difference in genotype distribution and allele frequencies among groups was assessed by χ^2 test. Comparison of variables between groups of genotypes was performed by Student's t-test or ANOVA test.

Results: A total of four variants G1182A (Thr394Thr), C1428G (Asp476Glu), G1444A (Gly482Ser) and A1584G (Thr528Thr) were identified in exon 8 of PGC-1. No variation was observed in the regions of other exons except exon 8. The frequencies of G1182A, C1428G, G1444A and A1584G were 10%, 18%, 42%, and 15%, respectively. For G1444A (Gly482Ser), as a functional polymorphism, Gly/Ser (G/A) heterozygout frequency was 55% for DM group and 35% for normal subjects. Interestingly, the peripheral blood mtDNA contents of the subjects with Gly/Gly genotype was decreased 20% compared to those with Gly/Ser or Ser/Ser ($p=0.011$ and $p=0.057$, respectively).

Conclusion: In Korean diabetic patients, Gly/Ser frequency was higher than the caucasians. The mtDNA copy number of Gly/Gly genotype was 20% lower than the genotypes with Ser allele. The results suggest that PGC-1 with the Gly/Gly genotype might impair the regulatory function of mitochondrial biogenesis, resulting in dysfunction of mtDNA replication, insulin resistance, and type 2 diabetes in consequence.

Key Words: Diabetes, Insulin resistance, PGC-1, SNP

서론

당뇨병의 발병은 개인의 유전적 배경에 의해 많은 영향을 받으며, 다인성 (polygenic) 유전양식을 보이기 때문에 당뇨병 감수성 유전자를 동정하려는 대규모 연구가 진행되어지고 있다. 그러나 환자 개인의 유전적 불균일성, 생활 및 환경인자 등이 당뇨병 발병에 추가적인 결정인자가 될 수 있기 때문에 유전학 분석을 위한 환자의 집단 선별은 매우 어렵다. 그러므로 genome wide scanning과 같은 전형적 genomic study로부터 동정된 유전자는 극소수이며, 아직도 장기적인 노력이 필요한 것으로 생각되어 진다. genome wide scan이 동정된 유전체에서 기능을 규명하는 대표적인 유전학적 방법이라면 functional genomics는 기능으로부터 유전자를 찾아가는 역방향의 연구이다. functional genomics의 한 예로 생리적 기능이 밝혀진 insulin receptor gene 등을 당뇨병 감수성 유전자로 예상하여 유전자의 변이 혹은 다형성을 환자 집단에서 검색하는 candidate gene association

study 등이 수행되고 있다^{1,2}.

우리 실험실에서는 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 양적, 질적 이상을 당뇨병 및 인슐린 저항증의 원인 유전자 중의 하나로 정의하는 일련의 결과를 보고한 바 있다. 매우 흥미롭게도 최근 Peterson 등은 lean body mass, fat mass와 나이 든 사람의 인슐린저항증이 상관관계를 가지고 있으며, 특히 미토콘드리아 oxidative phosphorylation 기능이 약 40%정도 저하되어 있음을 *in vivo* NMR 방법을 사용하여 보고하였다³. 미토콘드리아 관련 유전자들의 polymorphism은 미토콘드리아 기능 저하를 유발하고, 따라서 에너지 생성이 저하되어 당뇨병에 대한 감수성에 영향을 미칠 것으로 예측되기도 한다. 그러나 현재까지 mtDNA의 polymorphism에 대해서는 많이 보고되었으나 이와 관련된 핵 DNA 유래 유전자군의 polymorphism을 분석한 보고는 매우 적은 상태이다^{4,5}. 즉 미토콘드리아의 기능은 mtDNA에 의해 code되는 respiratory chain complex의 13개 subunit들 뿐 아니라, 대부분 (약 1000개 이상으로 추정) 핵유전자에 의해 코드된 후 세포질에서 단백질로 합성된 다음 미

토콘드리아 내로 수송되어 mtDNA의 복제 및 전사를 조절하거나, 그 외 다른 미토콘드리아 기능을 수행하는 단백질들에 의해 유지된다. 이러한 미토콘드리아의 biogenesis를 조절하는 것으로 알려진 핵 유래 유전자들은 mitochondrial transcription factor A (mtTFA, Tfam)^{6,7}, Peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivating factor-1 (PGC-1)^{8,9}, DNA Polymerase gamma (pol γ)¹⁰, mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein (mtSSB)¹¹, Endonuclease G (Endo G)¹¹, Nuclear Respiratory Factor-1 (NRF-1)¹² 등이 있다.

위의 후보 유전자들 중 특히 PGC-1은 저체온 처리시 brown fat과 muscle에 대량으로 발현되어 지고, UCP-2 (uncoupling protein-2)의 발현유도 및 NRF 활성조절을 통해 미토콘드리아 복제 (biogenesis)를 증가시킬 것으로 보고되어진다⁹. Lehman 등⁹과 Wu 등¹³은 PGC-1를 과량 발현한 mouse에서 mtDNA의 함량이 증가됨을 보고하였다. 또한 인슐린저항증 치료제인 thiazolidinediones의 수용체이며 adipogenesis를 촉진시키는 PPAR- γ 와 결합하여 coactivator로 작용하여 PPAR- γ 의 전사활성을 증가시키며, 또한 미토콘드리아 내 지방산 베타 산화 (fatty acid beta oxidation)에 관련된 유전자들의 전사활성을 조절하는 PPAR- α 의 coactivator이기도하다. 이와 같이 PGC-1은 에너지항상성 유지에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 근육에서는 Glut 4 (glucose transporter 4)의 발현을 조절하며¹⁴, 간에서는 gluconeogenesis에 관여하기도 한다¹⁵. Pima Indian의 QTL 연구에서 basal insulin 농도가 염색체 4p15.1과 연관성이 있다고 보고되는데, 이 위치에 PGC-1 gene이 존재한다^{16,17}. 따라서 PGC-1 gene의 유전자 변이는 비만, 인슐린저항증, 제2형 당뇨병의 감수성 유전자로 매우 유력하다.

PGC-1이 당뇨병 감수성 유전자인지를 확인하기 위한 여러 연구가 진행되었는데, Ek 등¹⁸은 덴마크 당뇨 환자들을 대상으로 한 연구에서, 총 7개의 PGC-1 variant가 존재함과, 그 중 Gly482Ser variant가 제2형 당뇨병 환자에서 정상 대조군에

비해 약 7% 정도 더 많이 발생하였다고 보고하였다. 그러나 Lacquemant 등¹⁹은 French Caucasian 대상 연구에서 Gly482Ser variant가 제2형 당뇨병과 관련성이 없다고 보고하였다. 같은 해, Hara 등²⁰은 일본인 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 3개의 PGC-1 variants와 함께 Gly482Ser variant가 fasting insulin 농도가 높고, insulin resistance index가 증가하여, PGC-1의 genotype과 인슐린 저항성 및 당뇨 감수성과 관련이 있을 것으로 보고하였다. 이와는 반대로 Pima indian을 대상으로 한 가장 최근의 연구는 Gly/Gly homozygote 그룹이 Ser variation을 가진 그룹에 비해 평균 복부 지방 크기가 크고, lipid oxidation 속도가 감소되어 있지만, 당뇨 또는 비만과의 관련성은 없다고 보고하였다²¹. 이와 같은 PGC-1 genetic variation과 당뇨, 지방대사, 당대사 간의 상관관계에 대한 엇갈린 보고들은 PGC-1의 genotype과 직접적 관련이 있는 다른 인자가 존재하고, 당뇨, 인슐린 저항성, 지방대사 등은 이 인자에 의해 조절되는 2차적 결과인 것으로 해석할 수도 있을 것이다.

PGC-1의 활성화에 의해 직접 조절되는 미토콘드리아의 biogenesis는 PGC-1 genetic variation에 의해 변화할 수 있는 가장 좋은 candidate가 될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 mtDNA의 복제수와 PGC-1 genotype과의 관련성을 조사하였다. 우선 한국인 집단에서의 유전자의 다형성을 발굴하기 위해 제2형 당뇨병 환자군, 정상대조군, 당뇨발생위험인자 보유군 등의 집단 표본을 추출하고, 이들의 혈액으로부터 genomic DNA를 추출하여, 13개 PGC-1 exon중 각 exon 지역을 PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 및 sequencing 방법으로 분석하는 candidate gene association study를 수행하였다. 그 결과 PGC-1 유전자에서 4개의 single nucleotide polymorphism (SNP)발굴하였으며, 이 중 G1444A (Gly482Ser) genotype과 각 임상표본에서 당뇨병의 위험인자로 쓰여지는 생화학적 지표 및 mtDNA copy 수와의 관계를 제2형 당뇨병 환자 및 심혈

관 질환 환자군을 포함한 환자 표본 집단, 제2형 당뇨병 환자의 자녀 집단, 임신성 당뇨 환자 (Gestational DM, GDM) 추적조사 집단 등 3가지 서로 다른 집단을 가지고 분석하였다.

대상, 재료 및 방법

1. 대상자

환자표본 집단 - 계명대 부속 동산병원에 내원한 환자 중 World Health Organization criteria에 의해 제2형 당뇨병으로 판정된 당뇨병 환자군 49인, 심혈관질환 (CAD) 환자군 42인, 건진센터에 내원한 정상대조군 46인을 우선 대상으로 하였다. 대상자의 혈액에서 DNA를 추출하여 PGC-1 polymorphism을 PCR SSCP 방법으로 분석하였다. 대상자의 인슐린저항증과 관련된 임상지표 (체중, 체질량지수, 혈중 glucose 농도, 혈중 triglyceride (TG), Cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, 혈중 인슐린) 및 mtDNA양을 측정하였다²². 이들의 임상적 특징은 Table 1A에 기술하였다.

제2형 당뇨병 환자의 자녀 집단 - 목동주민 연구에서 사용한 제2형 당뇨병 family history를 가진 대상자 82명과 이 대상자들에 대한 나이 성별, BMI를 맞춘 정상대조군 52명의 혈액에서 genomics DNA를 분리하였으며, 마찬가지로 임상지표 및 mtDNA양을 측정하고 PGC-1의 genotyping을 실시하였다. 당뇨병 환자의 자녀 총 82명중 제2형 당뇨병 환자 (DM)는 9명, impaired glucose tolerance (IGT)는 21명, normal glucose tolerance (NGT) 52명이었다. 따라서 이 집단은 위 환자 표본 집단의 기준으로 보면 총 133명중 124명이 제2형 당뇨병이 없는 정상대조군 (non-diabetic subject)로 분류될 수 있다. 이 집단의 임상적 특징은 Table 1B에 기술하였다.

임신성 당뇨 환자 추적조사 집단 - 임신성 당뇨 환자는 출산 후 혈당이 정상으로 회복되지만, 3년 이상 경과한 다음 제2형 당뇨병 환자로 전환

될 가능성이 매우 높다. 아주대학교 조남한 교수와의 공동 연구로 이들 임신성 당뇨 환자에 대한 3년간 추적 조사를 실시하고, 이들의 임상지표 및 mtDNA양을 측정하고 PGC-1의 genotyping을 실시하였다. 이들 조사군 역시 현재는 정상이나, 제2형 당뇨병 환자로 전환될 가능성이 높은 고위험군이다.

2. single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) assay

대상자의 혈액구에서 total genomic DNA를 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)을 사용하여 추출하였다. PGC-1의 single nucleotide polymorphism (SNP) 검출을 위해 1단계로 30명의 당뇨병 환자들의 DNA를 사용하였다. SNP 검출에 사용되는 PCR primer는 보고된 PGC-1의 13개 exon에 대한 genomic sequence (GenBank# AF108193 ~ AF108205)를 참고로 하여 각 exon을 포함하면서 product size가 200~300 bp가 되도록 고안하였다. 특히 exon의 크기가 큰 exon 8의 경우에는 4개 set의 primer를 제작하였다. 각 primer set의 염기서열은 Table 2에 요약하였다.

PCR-SSCP를 위해, 20ng의 genomic DNA를 사용하였고 30 μ L의 최종 반응용액에는 각 forward/reverse primer 25 pmol, 0.2 mM dNTP mixture, 1.5 mM MgCl₂, 1xPCR buffer, 1.5units of AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems)가 포함되었다. Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 thermocycler를 사용한 PCR 반응조건은 95°C 5분간 denaturation 후 94°C에서 30초 denaturation, 52°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분간 extension 반응으로 이루어진 반응을 35 cycles 후 마지막으로 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. 1% agarose gel에서 PCR product를 확인 후 SSCP 분석을 하였다. 즉, PCR product를 3 μ L loading dye (95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, and 10 mM EDTA)와 섞은 후 95°C에서 3분 가열 후 곧 ice에서 식혀 single-stranded

Table 1. Clinical Characteristics of Initial Study Subjects**A. Keimyung samples**

Characteristics	Normal	DM	CAD
n	46	49	40
Age (years)	55.8±0.8	55.1±1.2	60.9±1.2 [#]
BMI (kg/m ²)	23.5±2.7	22.6±0.6	24.6±0.4
FBS (mg/dL)	85.5±2.6 [†]	205.6±10.4	not determined
TG (mg/dL)	111.3±6.8 [*]	147.5±11.5	154.8±11.6
T-cholesterol (mg/dL)	177.6±5.1	195.7±17.2	181.3±6.6
HDL-c (mg/dL)	52.0±1.9	52.5±3.5	57.7±9.9

Normal denotes healthy subjects without DM and CAD; DM, diabetes mellitus; CAD, cardiovascular disease

Data are means±SEM. BMI denotes body mass index; FBS, fasting blood sugar; T-cholesterol, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol.

[#] denotes p<0.05 vs the other groups; [†], p<0.05 vs the DM group; ^{*} p<0.05 vs the other groups

B. Mokdong samples

Characteristics	Normal	NGT	IGT	DM
n	51	52	21	9
Age (years)	41.8±0.9	41.7±0.9	45.1±1.3	50.6±1.9
BMI (kg/m ²)	24.0±0.3	23.7±0.4	24.2±0.7	25.8±0.7
FBS (mg/dL)	86.8±1.2	89.7±1.3	95.7±3.0	139.1±13.8
TG (mg/dL)	127.3±10.9	141.3±14.8	215.4±44.4	156.6±19.9
T-cholesterol (mg/dL)	185.8±4.8	188.5±4.7	211.1±8.7	223.9±14.0
HDL-c (mg/dL)	45.8±1.5	45.2±1.7	47.9±2.3	46.8±4.1

Normal, normal without DM family history; NGT, normal glucose tolerance; IGT, Data are means±SEM. BMI denotes body mass index; FBS, fasting blood sugar; T-cholesterol, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol.

structure를 만든 후 10% glycerol을 함유하는 8% polyacrylamide gels에 loading 후 Multiphor II system electrophoresis apparatus (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 14℃ 또는 20℃에서 100V overnight 한 후 500V 1.5h동안 전기영동하였다. horizontal gel은 Plus One DNA Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech)으로 staining해서 polymorphism을 검출하였다.

PCR-SSCP에 의해서 band shift를 보이는 sample은 다시 PCR한 후, PCR product band를 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)을 사용하여 DNA를 회수하고, pGEM-Teasy vector에 cloning 하였다. plasmid DNA를 추출해서 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready reaction kit (PE

Biosystems)로 반응시킨 후, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer를 이용하여 automatic DNA sequencing을 수행하였다. 이 때 T7과 SP6 primer를 사용하여 sense와 antisense strand의 sequence를 확인하였고, DNA 염기배열의 변화에 의해서 아미노산이 치환되는 polymorphism을 선별하였다. 최종 선별된 functional polymorphism에 대해 PCR-RFLP법을 이용하여 다른 환자군의 genotyping에 이용하였다.

genotype이나 allele의 분포는 χ^2 test로 분석하였다. 대조군과 환자군간의 임상지표의 차이는 student t-test로 분석하였다. SNP type에 따른 임상지표 차이는 SPSS software를 사용하여 ANOVA나 t-test로 분석하였다.

Table 2. Primer Sequences and PCR Product Sizes for Mutational Analysis of Human PGC-1 Exons

Region	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'	PCR fragment (bp)
Exon 1	GAGTGACAGCCCAGCCTACT	AAGCGTCAGTTGTGGCTGCA	270
Exon 2	TAATGGAAGCTTTTTTAAAT	AACTCAATGAAAAATTAATG	262
Exon 3	TGTTACCTGCCTCCCAGGGT	TTCCTGCTAAACAGTAGGAA	280
Exon 4	ATGCATAACTTTACTTGCTT	ACTGCTTCAAGCCAAAATCC	230
Exon 5	TTAGCTTTCTTTATGCCTTG	TTCCCTCACCAACAGCTCGT	270
Exon 6	CCAAAATAAGTTTCCTTTTTTTTTTC	AGTTATGGCACATTTATAAA	177
Exon 7	AAAGGGAAGGGGGTTCTAAT	CATAGACAGTACACTCTGTT	240
Exon 8-1	TTTTTTTTTTTAAATTTTTGC	CTTGGTCTTCCTTTTCCTCGT	270
Exon 8-2	TCAGCAAGTCCTCAGTCCTC	TGCAAGGAGAGACCTGCTTG	270
Exon 8-3	GTGCTACCTGAGAGAGACTT	AGGGTAGCTCAGTTTATCAC	280
Exon 8-4	TGATGACAGCGAAGATGAAA	AGGGTTTTGCCAAGGTTTAC	290
Exon 9	GTGTCCCAGAGGATGCTCCA	GCTAAAGGAAAAATGACATGC	220
Exon 10	GATGACAAGATGTTCTCCAA	AAAAGTGAGCTCCAGGCCAC	250
Exon 11	TGTGAGCCACTGTGCCCGGC	ACATACGTGAGCTTCTAAAC	240
Exon 12	GTTACAGTCCCATATACTAA	AGCTCTACATTAAGGATTCC	260
Exon 13	AATGATTGAGTAATGGCCAT	ACGCGCTGTCCCATGAGGTA	210

3. PCR-RFLP assay

PCR-SSCP에 의해 선별된 SNP 중 G1444A (Gly482Ser)은 wild type의 MspI restriction site인 CCGG가 CCAG로 mutation 되는 것으로 MspI site을 잃게 된다. 따라서 다른 임상표본을 스크리닝하기 위해 280 bp PCR product가 MspI로 절단되는지를 다음과 같이 확인하였다. 즉, 위에 기술한 것과 같이 PGC-1의 exon 8-3 부위를 amplify 한 후 PCR product를 70% ethanol로 침전하여 회수하고, 회수된 PCR fragment를 MspI으로 37℃에서 overnight 처리한 후 2% agarose gel로 분리한 후, 확인하였다.

4. mtDNA 양의 측정

mtDNA content는 real time PCR 방법을 사용하였으며, 이미 기술한대로²² ABI Prism 7700 (PE Biosystems, CA)을 사용하여 측정하였다. mtDNA 양은 동시에 측정한 핵 DNA에 존재하는 28S

rRNA의 양으로 보정하였으며, 각 실험간의 오차를 보정하기 위해 정상대조군의 mtDNA 평균치를 100%로 한 후 각 실험치를 % Control로 표기하였다.

결 과

1. PGC-1 유전자 구조와 한국인에서 동정된 SNP

PGC-1 유전자는 약 50kb의 genomic DNA로부터 유래한 13개의 exon으로 구성되어 있으며, 총 799개의 아미노산을 가지는 단백질이다. Fig. 1은 human PGC-1의 유전자 및 단백질의 구성을 도식적으로 보여준다. 13개의 exon에 대해 Table 2에서 요약한 primer set와 계명대 환자 DNA 시료를 사용하여 PCR-SSCP assay를 수행한 결과 exon 8을 제외한 다른 exon에서는 어떤 SNP도 발견하지 못하였다. 반면 exon 8에서는 4개의 SNP를 검

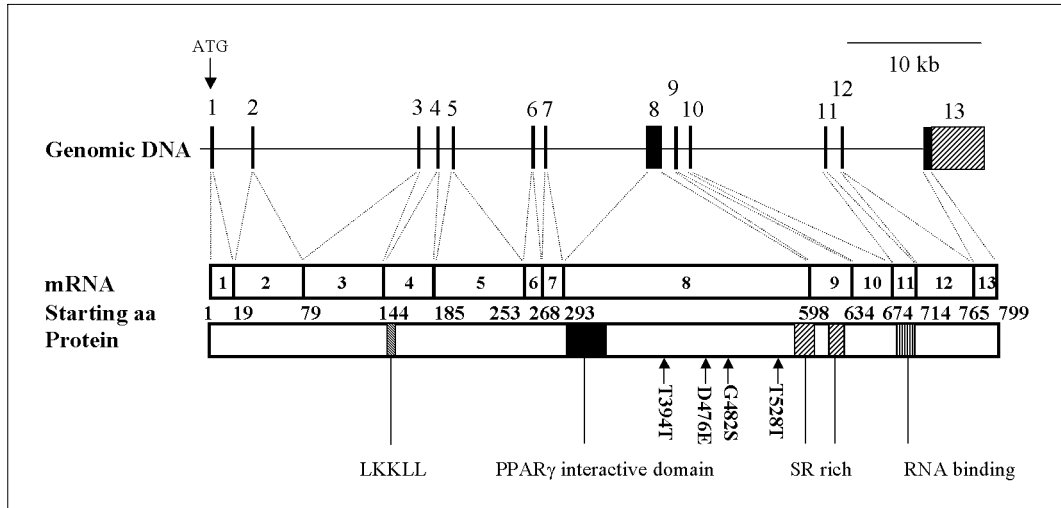


Fig. 1. Organization of the human PGC-1 gene and protein. The approximate positions of variants relative to genomic DNA, exons (mRNA), the starting amino acid numbers of each exon, and known functional domains of protein are shown. LKKLL, dimerization motif (LXXLL); SR rich, serine and arginine rich domain; RNA binding, RNA binding motif; the PPAR- γ interactive domain.

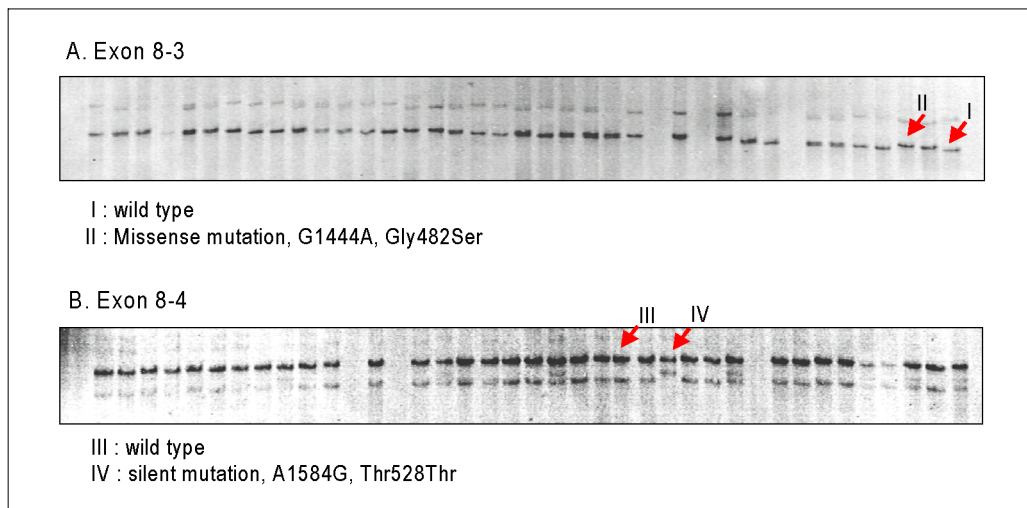


Fig. 2. The PCR-SSCP polymorphism of human PGC-1. The exon 8 (A, 8-3; B, 8-4) of PGC-1 was amplified as described in Methods and their PCR products were analyzed on 8-10% PAGE. The arrows indicate the samples with different PCR fragment conformation, which were cloned in T-vector and sequenced. The mutations of G1444A (Gly482Ser) and A1584G (Thr528Thr) were identified from these variants.

출하였다. Fig. 2는 이중 2개의 PCR-SSCP gel pattern을 보여준다. SSCP pattern이 다르게 나타난 시료의 PCR product를 T-vector에 subclone하

고 automatic sequencing 방법으로 유전자 변이를 조사하였다. exon8-2 지역에서는 1182 position에서 G to A의 transition이, exon8-3지역에서는 1428

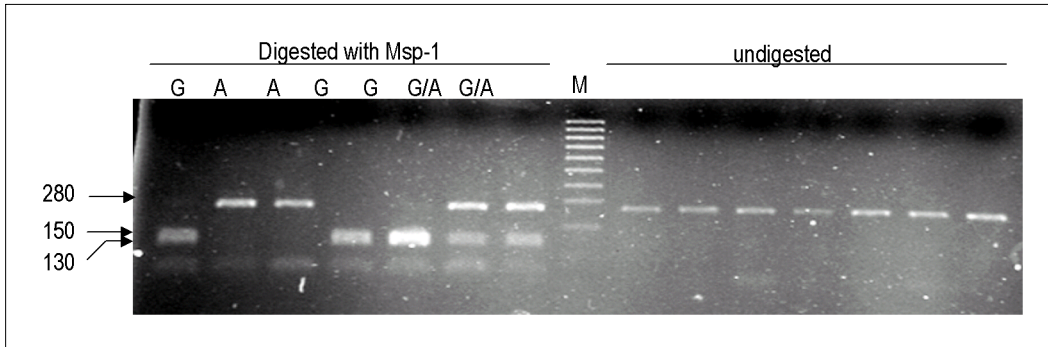


Fig. 3. PCR-RFLP detection of the Gly482Ser PGC-1 missense mutation. The PCR product of exon 8-3 were digested with Msp-1 and analyzed on 2% agarose gel electrophoresis. Expected product sizes are following; G1444 homozygote (Gly/Gly), 150 and 130 bp; A1444 homozygote (Ser/Ser), 280bp; and G/A heterozygote (Gly/Ser), 280, 150 and 130 bp. M denotes 100 bp molecular weight marker.

position에서 C to G의 transversion이, 1444 position에서 G to A의 transition, 그리고 exon8-4 지역에서는 1584 position에서 A to G transition을 관찰하였다. 특히 1444 position부근의 sequence는 MspI restriction enzyme에 의해서 절단되는 site (CCGG)가 존재하였다. G1182A의 경우는 silent mutation이고, C1428G는 aspartic acid476가 glutamic acid476로, 그리고 G1444A는 glycine482을 serine482으로 치환시켰다. 이 4개의 SNP는 Ek 등¹⁸이 2001년 보고한 PGC-1의 7개의 SNP중 3개와 일치하며, C1428G (Asp476Glu)은 일치하지 않는다. PGC-1 exon8에서 동정된 4개의 SNP의 발생 frequency를 계명대 환자 시료의 PCR-SSCP typing을 통해 측정된 결과를 Table 3에 요약하였다. 아주대 병원에서 제공받은 임신성 당뇨병환자 샘플을 PCR-SSCP 방법으로 분석하였을 때에도 유사한 결과를 얻었다.

2. 환자 phenotype에 따른 G1444A (Gly482Ser) genotype 분포

PGC-1의 1444 position의 sequence는 MspI restriction site를 포함하므로, Table 2의 exon8-3부위를 PCR로 증폭하고, 얻어진 PCR fragment를 MspI로 digestion한 후, 2% agarose gel에서 전

Table 3. Frequency of Each Genotype of the Human PGC-1 Gene by PCR-SSCP Analyses

Nucleotide position	amino acid substitution	Frequency
G1182A	Thr394Thr	0.10
C1428G	Asp476Glu	0.18
G1444A	Gly428Ser	0.42
A1584G	Thr528Thr	0.15

기영동하여 genotype을 결정하였다. Fig. 3은 이러한 PCR-RFLP법을 이용해서 genotyping했을 때 얻어지는 결과를 보여준다. 즉 G/G (Gly/Gly) homozygote (W)인 경우에는 CCGG를 포함하여 MspI에 의해 절단되므로 150와 130bp fragment가 형성되고, A/A (Ser/Ser) homozygote(M)인 경우는 CCAG로 되어 restriction enzyme site를 잃어버리므로 280 bp의 PCR product만을 나타낸다. 그리고 G/A (Gly/Ser) heterozygote(H)인 경우는 280, 150 그리고 130 bp의 3개의 fragment를 형성한다. Fig. 3은 G1444A의 PCR-RFLP genotyping pattern을 보여준다.

이 방법으로 계명대 당뇨 및 CAD 환자군, 목동 당뇨환자 자녀군, 그리고 임신성 당뇨환자군

Table 4. Genotype and Allele Frequencies of the G1444A (Gly482Ser) Variant of PGC-1 Gene in Type 2 Diabetic Patients, Offsprings of Diabetic Patients, or GDM Patients

	Gly/Gly	Gly/Ser	Ser/Ser	total	allele frequency of Ser allele
1. Keimyung samples					
N	16 (34.8)	16 (34.8)	14 (30.4)	46 (33.6)	0.48
DM	14 (28.6)	27 (55.1)	8 (16.3)	49 (35.8)	0.44
CAD	18 (42.8)	20 (47.6)	4 (9.5)	42 (30.7)	0.33
total	48 (35.0)	63 (46.0)	26 (19.0)	137 (100)	0.42
2. Mokdong samples					
N	15 (29.4)	23 (45.1)	13 (25.5)	51 (38.3)	0.49
NGT	12 (23.1)	26 (48.1)	15 (28.8)	52 (39.1)	0.50
IGT	8 (38.1)	9 (42.9)	4 (19.0)	21 (15.8)	0.39
DM	4 (44.4)	4 (44.4)	1 (11.1)	9 (6.8)	0.33
total	39 (29.3)	61 (45.9)	33 (24.8)	133 (100)	0.47
3. Ajou samples					
GDM	35 (38.9)	40 (44.4)	15 (16.7)	90 (55.9)	0.39
IGT	21 (29.6)	34 (47.6)	16 (22.5)	71 (44.1)	0.46
total	56 (34.8)	74 (46.0)	31 (19.3)	161 (100)	0.42

Data are number of subjects with each genotype (% of each group) and allele frequencies of A allele.

의 혈액 genomic DNA를 사용하여 genotyping한 결과를 Table 4에 나타냈다. 3개의 실험군 모두에서 Gly/Gly (G/G) homozygote은 30~35%, Gly/Ser (G/A) heterozygote는 약 46%, Ser/Ser (A/A) homozygote은 19~24%의 분포를 나타냈다. 이 결과는 G1444A mutation이 당뇨와 association이 없다고 발표한 French caucasian의 결과인 43%, 43%, 14%와 각각 비교할 때, G/G의 분포는 낮고, A/A는 더 높은 비율로 존재하였으며, G/A는 비슷하였다. 한편 정상인에서 G/G homozygote의 비율이 약 50%가 되어 40%인 제2형 당뇨병환자군에 비해 통계적으로 유의성 있는 관련성을 보여준 덴마크 환자 연구와는 다르게, 한국인 환자군, 당뇨 위험군에서 G/G genotype의 분포는 당뇨군, NGT, IGT, 임신성당뇨병 환자 (GDM, IGT) 등의 group과 정상군과 차이가 거의 없었다.

3. G1444A genotype과 mtDNA copy 수와의 상관관계

PGC-1의 genotype에 따라 각 조사 집단에 대해 임상지표를 분석하였을 때, 각 집단간의 환자특성이 많이 달라서인지, 관련성 있는 지표를 찾기 어려웠다. 또한 질병이 없는 것으로 분류된 당뇨 환자 연구의 정상대조군과 당뇨병 환자 자녀연구에서 분류한 정상군만을 합하여 genotype에 따른 임상지표를 조사하였을 때, 유의성 있는 차이를 보이는 임상지표는 없었다 (data not shown). 한편, PGC-1 Gly482Ser의 genotype에 대한 한국인의 집단 연구결과를 다른 서양인 (프랑스와 덴마크)을 대상으로 한 연구결과와 비교할 때, 서양인에서는 Gly/Gly variant가 약 35~40%의 발생 빈도를 보이는 반면 한국인에서는 30% 미만으로

Table 5. Clinical Characteristics of Each Genotype of PGC-1 at 482 Amino acid

genotypes	Gly/Gly	Gly/Ser	Ser/Ser
n	81 (32.0%)	115 (45.5%)	57 (22.5%)
Age	50.7 $\pm$ 1.0	49.5 $\pm$ 1.0	49.5 $\pm$ 1.2
BMI (kg/m ²)	23.7 $\pm$ 0.4	23.7 $\pm$ 0.3	24.0 $\pm$ 0.4
TG (mg/dL)	138.1.3 $\pm$ 1.4	156.7 $\pm$ 0.2	123.3 $\pm$ 9.0*
T-cholesterol (mg/dL)	182.8 $\pm$ 5.2	190.2 $\pm$ 3.8	196.3 $\pm$ 2.2
HDL-c (mg/dL)	48.2 $\pm$ 1.7	51.9 $\pm$ 4.0	49.1 $\pm$ 2.0
mtDNA (%control)	84.9 $\pm$ 5.8 [†]	108.4 $\pm$ 7.1	104.0 $\pm$ 8.5

Data are means $\pm$ SEM * p=0.016 vs Gly/Ser; [†]p=0.011 vs Gly/Ser

나타났으며, Ser/Ser은 서양인에서 약 15%, 한국인에서는 약 23%의 발생 빈도를 보였다.

각 연구집단에서 분리한 genomic DNA를 이용하여 혈액내 mtDNA copy수를 측정하였을 때, 매우 흥미로운 결과를 보였다. 단지 이때, mtDNA copy수의 측정 방법이 매우 정밀하게 수행하여도 interassay variation이 높아서 각 assay에서 정상군의 평균 mtDNA copy수치를 100%로 하여 보정하여 계산하였다. 그 결과 Gly/Gly variant의 mtDNA copy 수는 84.9 $\pm$ 5.8%, Gly/Ser은 108.4 $\pm$ 7.1%, Ser/Ser은 104.0 $\pm$ 8.5%로 Gly/Gly variant가 A(Ser) variant에 비해 약 22% 정도 mtDNA copy수가 감소하였다 (p=0.011)(Table 5).

고 찰

미토콘드리아의 이상은 당뇨병 발병과 밀접한 관계가 있다. 현재 mtDNA의 양적, 질적 이상이 당뇨병 발병과 밀접한 관계가 있다고 많이 보고되고 있다. 한편 미토콘드리아 DNA 복제나 전사, 미토콘드리아의 기능을 조절하면서 핵 유전자에 의해서 code되는 단백질들도 당뇨병 감수성 유전자로서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 미토콘드리아의 기능 조절 및 생

성에 관련된 여러 유전자중 최근 미토콘드리아 biogenesis의 master 조절 유전자로 알려진 PGC-1의 유전자 다형성 (gene polymorphism)을 발굴하고 당뇨병 발생과 mtDNA copy수와의 상관관계를 분석하였다.

이 연구가 진행되는 동안 덴마크, 프랑스, 일본 등에서 PGC-1의 novel SNP을 발굴하고, 특히 Gly482Ser variation과 제2형 당뇨병 발생간의 관련성을 조사하는 연구들이 발표되었다. 우선 우리연구에서는 exon8에서만 4개의 SNP을 관찰한 데 비해, 덴마크 연구에서는 exon8의 4개를 포함한 7개의 SNP을 보고하였다. 덴마크연구에서는 Ser/Ser의 분포가 당뇨군의 15%, 정상군에서 11~15%였다¹⁸. 반면 한국인의 경우 Ser/Ser의 분포가 당뇨군에서는 16% 정도인 반면 정상군에서는 30% 정도로, 질병이 없는 경우 Ser/Ser variation의 분포가 높았다 (Table 4). 프랑스 연구의 경우는 정상과 당뇨환자군 간의 분포차이를 보이지 않았으며¹⁹, 일본연구의 경우도 당뇨환자군과 정상군에서의 분포차이를 보고하지 않았지만 두 군간의 분포차이는 없다고 하였다. 단지 일본인 연구의 경우는 Ser variants (Gly/Ser, Ser/Ser)가 fasting insulin 농도와 인슐린저항성 지표인 HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance)가 증가하여 있었다. 이와는 반대로

Pima Indinan을 대상으로 한 가장 최근의 연구는 Gly/Gly와 Ser variants의 분포가 당뇨 및 BMI와 관련성이 없었으며, 오히려 정상군에서 Gly/Gly genotype을 가진 사람들이 glucose에 대한 인슐린 분비기능이 저하되고 지방산화 속도가 감소되어 있다고 보고하였다²¹. 흥미롭게도 Gly/Gly genotype이 지방세포의 크기가 크고, 유리지방산의 농도도 높았다. 이에 Muller 등은 PGC-1의 Gly/Gly type이 지방대사 및 인슐린 분비능을 저하시키는 것과 관련될 가능성을 제시하였다.

본 연구에서도 당뇨병자군과 정상군에서 각 genotype 분포의 차이는 관찰할 수 없었다. 단지 Ser/Ser genotype의 분포가 정상에서 약간 많았다. 전 실험대상군을 genotype으로만 분류하여 임상 지표 및 mtDNA 등을 비교하였을 때, 다른 지표는 거의 차이가 없었으며, 단지 Gly/Gly type이 TG가 높고 mtDNA copy가 낮았다 (Table 5). 이 분석 결과는 Gly/Gly variation과 mtDNA copy 수간의 상관관계가 존재할 것을 시사한다. 즉, PGC-1의 Gly/Gly variant가 mtDNA replication의 기능 감소를 유발할 수 있을 가능성을 제시하는데, 만일 PGC-1의 Gly/Gly variant가 Ser을 포함하는 variant에 비해 mitochondrial biogenesis를 조절하는 기능이 저하되어 있다면, 우리 연구그룹에서 제안해 왔던 “mtDNA copy수의 감소가 인슐린저항증, 나아가 당뇨의 발생의 원인이 될 수 있다”는 가설에 대한 매우 중요한 유전학적 정보가 될 것이다.

요 약

연구배경: 미토콘드리아의 기능이상인 당뇨병 발병을 유발하는 것으로 보이는 보고들이 축적되고 있다. 미토콘드리아 기능 이상을 초래하는 인자로는 미토콘드리아 DNA의 양적, 질적 변화와 핵 유전자에 의해 코드되며 미토콘드리아 biogenesis를 조절하는 단백질의 기능 이상이 포함될 수 있

으며, 이들은 당뇨병 발병에 대한 감수성 유전자로서 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 최근 미토콘드리아 biogenesis 조절기능과 함께 adipogenesis, 지방대사, gluconeogenesis 등에 중요한 기능을 하는 것으로 보고된 PPAR-gamma coactivator-1 (PGC-1)의 유전자 다형성 (gene polymorphism)과 미토콘드리아 DNA 복제수, 그리고 당뇨병 발병 및 인슐린저항증 발생과의 연관성을 규명하고자 하였다.

방법: 정상인 (46인) 및 제2형 당뇨병환자 (49인), 심혈관질환 환자 (42인)군에서 genomic DNA 추출하고 이들 유전자에 새로운 단일유전자 다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)이 존재하는 지를 PCR-SSCP 방법으로 조사하였다. 발견된 SNP중 변이에 의해 MspI으로 절단되는 G1444A에 대해 목동주민시료 (133인) 및 임신성 당뇨병환자 (161인)에 대한 검색을 한 후, G1444A와 당뇨병 및 인슐린저항성의 임상적 지표, 그리고 mtDNA copy 수와의 관련성을 연구하였다.

결과: PGC-1은 13개의 exon이 존재하며 그 중에서 Exon 8에서 G1182A (Thr394Thr), C1428G (Asp476Glu), G1444A (Gly482Ser), 그리고 A1584G (Thr528Thr)의 4개의 polymorphism이 검출되었다. 이들의 frequency는 각각 0.10, 0.18, 0.42, 그리고 0.15로, G1444A의 변이 빈도가 가장 높게 나타났다. 또한, 4개의 polymorphism 중에서 2개에서만 amino acid 치환이 관찰되었는데, 각각 Asp476Glu와 Gly482Ser이었다. PGC-1에서 Gly482Ser site의 Gly/Ser heterozygote 비율은 정상에서는 35%였고 DM군에서는 55%로, 정상군보다 DM군에서 약 1.5배 더 높게 나타났다. 흥미롭게도 Gly/Gly homozygote는 Gly/Ser 또는 Ser/Ser에 비해 mtDNA 복제수가 약 20% 감소되어 있었다 (각각 $p=0.011$, $p=0.057$).

결론: 한국인 당뇨병환자에서 PGC-1의 Gly/Ser genotype이 더 많이 관찰되었으며, 특히 Gly/Gly genotype은 Ser allele을 가진 군에 비해 mtDNA 복제수가 감소되어 있었다. 이 결과는 PGC-1의

Gly/Gly genotype은 mtDNA biogenesis를 조절하는 기능이 감소되어 있으며, 이것은 mtDNA 복제수의 감소 및 미토콘드리아 기능 감소를 초래할 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병을 유발시킬 수 있는 개연성을 제시한다.

참 고 문 헌

1. Taylor SI, Cama A, Accili D, Kadowaki H, Kadowaki T. Mutations in the insulin receptor gene. *Endocr Rev* 1992;13:28-36
2. Accili D, Frapier C. A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-resistant diabetes. *EMBO J* 1989;8:2509-2517
3. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003;300:1140-1142
4. Wallace DC. Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative disease? *Science* 1992;265:628-632
5. van der Ouweland JM, Lemkes HH. Mutation in mitochondrial tRNA gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1992;1:368-377
6. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 1998;18(3):231-236
7. Larsson NG, Oldfors A, Holme E, Clayton DA. Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1994;200:1374-1381
8. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM. Activation of PPAR γ Coactivator-1 through Transcription factor pocking. *Science*. 1999 Nov 12;286(5443):1368-1371
9. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000;106(7):847-856
10. Spelbrink JK, Tovonen JM. In vivo functional analysis of human mitochondrial DNA polymerase POLG expressed in cultured human cells. *J Biol Chem* 2000;275:24818-24828
11. Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carrillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, Zeviani M. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* 1995;25(2):559-564
12. Virbasius JV and Scarpulla RC, Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1309-1313
13. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 *Cell* 1999;98(1):115-124.
14. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP,

- Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):3820-3825
15. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelman G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001;413(6852):131-138
 16. Pratley RE, Thompson DB, Prochazka M, Baier L, Mott D, Ravussin E, Sakul H, Ehm MG, Burns DK, Foroud T, Garvey WT, Hanson RL, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J Clin Invest* 1998;101(8):1757-1764
 17. Esterbauer H, Oberkofler H. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization and tissue expression. *Genomics* 1999;62:98-102
 18. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Gaede PH, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44(12):2220-2226
 19. Lacquemant C, Chikri M, Boutin P, Samson C, Froguel P. No association between the G482S polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene and Type II diabetes in French Caucasians. *Diabetologia* 2002;45(4):602-604
 20. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* 2002;45(5):740-743
 21. Muller YL, Borgardus C, Pedersen O, and Baier L. A gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in pima indians. *Diabetes* 2003;52:895-898
 22. Song J, Oh JY, Sung YA, Pak YK, Park KS, Lee HK. Peripheral blood mitochondrial DNA content is related to insulin sensitivity in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001;24(5):865-9