원 저

대한신경과학회지 17(1):63~71, 1999 ISSN 1225-7044

한국인 파킨슨병에서 Monoamine Oxidase B 유전자와 Cytochrome P450IID6 유전자의 다형성

한동대학교 선린병원 신경과, 계명대학교 의과대학 신경과학교실* 및 의과학연구소**

이용희 · 임정근* · 이상도* · 이영재**

Monoamine Oxidase B Gene and Cytochrome P450IID6 Gene Polymorphism in Sporadic Korean Parkinson's Disease

Yong-Hee Lee,M.D., Jeong-Geun Lim,M.D.*, Sang-Doe Yi,M.D.*, Young-Jae Lee,Ph.D.**

Department of Neurology, Handong University Sunlin Hospital
Department of Neurology and Institute for Medical Science*, Keimyung University School of Medicine*

Background : Epidemiological studies have identified that positive family history and frequent exposures to environmental toxins such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) are of prime causative factors for PD. These toxins are mainly metabolized by MAO-B and CYP2D6. Thus, an individual with inherited defect in xenobiotic metabolism could have a higher susceptibility to PD. We performed this study to investigate a possible allelic association of MAO-B and CYP2D6 known to be involved in metabolism of dopamine and other drugs such as debrisoquine in PD. **Methods** : We studied polymorphism of MAO-B and CYP2D6 genes in 69 sporadic idiopathic PD patients (31 males and 38 females) and 41 age-matched healthy control (20 males and 21 females) using genomic DNA extracted from peripheral blood white cell with polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Results** : There were eight different alleles of various numbers of GT repeats within the second intron of MAO-B. The frequency of $(GT)_{20}$ allele was the highest (44.7%) in PD, while the frequencies of $(GT)_{14}$ allele and $(GT)_{19}$ allele were the highest in control groups. Furthermore, the odds ratios of $(GT)_{16}$ allele and $(GT)_{20}$ allele were 4.93 (95% confidence interval 0.6-107.63) and 6.15 (95% confidence interval; 2.52-15.51), respectively, suggesting a higher susceptibility to PD in $(GT)_{20}$ allelic group ($p<0.001$). Polymorphism of CYP2D6 was also examined by PCR amplification followed by digestion with restriction enzymes. However, we were unable to identify G to A substitution at the junction of intron 3 and exon 4 nor base pair deletion in exon 5 from PD and control groups, which have been reported previously. **Conclusions** : These results suggest that the MAO-B gene polymorphism could serve as a determinant of genetic susceptibility to PD at least in Korean population. But the susceptibility may not be directly associated with polymorphism of CYP2D6 gene examined in this study.
J Kor Neurol Ass 17(1):63~71, 1999

Key Words : Parkinson's disease, Monoamine oxidase B, CYP2D6, Gene polymorphism

서 론

파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 흑질(substantia nigra, SN)의 도파민 신경원의 뚜렷한 소실을 주된 병리소견으로 보이는 중추신경계에서 흔히 발생하는 노인성 퇴행성 질환이다.[1] 대부분의 신경계 퇴행성 질환에서처럼 PD의 원인은 아직 밝혀져 있지 않으며 유전적 요인과 환경적 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 추측되고 있다. 체염색체 우성유전 양상을 보이는 가족형 PD가 보고되고 있고[2] 비가족형 산발성 PD인 경우에도 친척 중에서 PD에 이환될 위험도가 높다고 한다.[3] 또한 그 동안 쌍생아 연구[4]에서PD의 유전적 원인에 대하여 확실한 증거를 제시하지 못하였으나 다른 연구[5]에서 PD의 쌍생아 형제들이 임상적으로 PD를 보이지 않는다 하더라도 PET검사에서 PD를 시사하는 이상소견을 보이는 빈도가 높다고 보고되어 쌍생아 연구도 PD의 유전 가능성을 뒷받침하는 것으로 평가되어진다. 한편 역학적 조사는 산업화된 사회, 농업화학물을 많이 사용하는 농촌

Manuscript received September 24, 1998.
Accepted in final form November 2, 1998.
* Address for correspondence
Sang-Doe Yi, M.D.
Department of Neurology, College of Medicine,
Keimyung University, Dongsan Hospital,
Dongsan-dong 194, Chung-ku, Taegu, 700-310, Korea
Tel : +82-53-250-7832 Fax : +82-53-250-7840
E-mail : sdlee@dsmc.or.kr

지역, 또는 우물물을 마시는 지역 등에서 PD의 발생율이 높다는 사실을 보임으로 PD의 원인으로서 환경적인 요인을 시사해 왔다.[6-7] 외인성 신경독성물질인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)의 대사물인 MPP^+가 SN의 도파민 신경세포를 선택적으로 파괴함으로써 PD를 일으킨다는 사실이 밝혀졌으며[8] MPTP와 구조적으로 유사한 자연계 산물인 tetrahydro-βcarbolines이나 tetrahydroisoquinoline(TIQ) 등도 PD의 가능한 원인 물질로 밝혀졌다.[9] 그러므로 유전적인 요인과 환경적인 요인 및 연령의 증가등이 상호 작용하여 PD의 발생에 관여하는 것으로 보인다. 예컨데 환경적 신경독성물질에 대한 감수성이 유전적으로 높을 때 PD가 발생될 수 있을 것이다. 단가아민산화효소 B(monoamine oxidase B, MAO-B)는 도파민과 같은 아민계 신경전달 물질을 대사하는 주된 효소이다. MAO-B는 도파민의 산화를 통하여 H_2O_2를 생성하고 H_2O_2는 Fe^{2+} 존재 하에서 ·OH를 산생시켜 도파민 신경세포를 파괴시킬 수 있다. 또한 MAO-B는 MPTP로부터 활성대사물인 MPP^+를 산생시켜 이것이 미토콘드리아의 호흡쇄(respiratory chain)의 NADH 조효소인 Q1 reductase를 억압하여 ATP 생산을 방해하여 세포사를 일으키고[10] 미토콘드리아의 기능장애로 인하여 생성된 반응성 산소물로 인하여 산화제(oxidant) 스트레스가 작용하여 도파민 신경세포를 파괴시켜 PD를 발생시킬 수 있다.[11] 또한 MAO-B의 유전자는 X p11.3 부위에 위치해 있는데[12] MAO-B 유전자의 돌연변이는 MAO-B의 기능장애를 초래하여 신경독성물질에 대한 감수성을 증가시켜 PD의 발생을 높일 수 있다.

한편 사이토크롬 P450계(cytochrome P450 system)내의 한 효소인 사이토크롬 P450ⅡD6 즉 debrisoquine 4-hydroxylase(DH)는 debrisoquine이나 sparteine 뿐 만 아니라 MPTP, MPP^+ 및 TIQ를 비롯한 여러 환경독성물질을 처리하는 효소로 알려져 있다.[9] DH는 뇌의 SN에 분포되어 있고 MPTP를 비독성 물질인 4-hydroxy-MPTP로 대사시키는 것으로 알려져 있다.[13] MPTP의 신경독성 효과는 MAO-B에 의한 MPTP의 대사물인 MPP^+에 의하여 주로 일어나며 MPP^+는 도파민 운반자(dopamine transporter, DAT) 에 의하여 SN의 도파민 신경세포 내로 들어가서 독성작용을 일으킨다.[14] DH는 DAT에 의하여 운반된 MPTP와 MPP^+가 도파민 신경세포 내로 들어가는 것을 억제함으로써 이들 독성물질에 의한 도파민 신경세포의 파괴를 막아주는 것으로 추정된다.[13] 그러므로 DH의 기능 이상은 도파민 신경세포의 파괴를 초래할 수 있는 것으로 추론된다. 또한 CYP2D6 유전자는 chromosome 22 q13 부위에 위치해 있으면서[15] DH의 활성도를 결정하게 되는데 DH의 활성도가 낮은 사람을 대사기능이 낮은 자(poor metabolizer, PM), 활성도가 높은 사람을 대사기능이 좋은 자(extensive metabolizer, EM)로 말하며 CYP2D6 유전자의 다형성이 PM과 EM을 결정한다.[16] PM에서는 25개가 넘는 약물의 비효율적인 대사를 일으킴으로 PM 집단에서는 이들 약물에 대한 부작용의 위험이 훨씬 높은 것으로 알려져 있다.[17] 또한 이들 집단에서 PD의 발병 연령이 낮고 병의 진행이 빠르며 발병율도 높은 것으로 알려져 있다.[15,18-19]

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 제한편절길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)을 이용하여 어떤 질환의 병인에 관여하리라고 추정되는 후보 유전자(candidate genes)의 유전자 다형성(genetic polymorphism)을 찾고 특정 질환에 있어서 변이 유전자를 갖는 대립유전자의 빈도(allelic frequency)를 조사하여 그 질환과의 연관성을 보는 방법은 PD와 같은 복합적인 원인에 의하여 발생되는 것으로 알려져 있는 질환의 유전적인 소인을 찾는데 유용한 방법이다.[20-21] 이러한 방법을 이용하여 MAO-B 유전자 또는 CYP2D6 유전자와 PD와의 관계를 별도로 조사한 연구들[18-19,22-23]이 있었지만 상충되는 결과를 보고하였다. 상충된 결과를 보인 원인은 여러 가지가 있겠으나 연구대상들의 인종적인 차이가 중요한 원인으로 지적되고 있다.[24]

저자는 연구대상들의 인종적인 동질성이 유지된 것으로 판단되며 다른 인종들과는 다른 유전적 다형성을 보일 것으로 추측되는 한국인을 대상으로 PD와 대조군에서 MAO-B 유전자와 CYP2D6 유전자의 다형성을 조사하여 한국인에서 이들 유전자와 PD와의 관계를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 혈액채취

이 연구는 계명대학교 동산의료원 신경과에서 다음과 같은 진단기준에 부합하는 환자를 대상으로 하였다. ① 안정시 진전 (resting tremor), 톱니바퀴 경직 (cogwheel rigidity), 서동 (bradykinesia), 그리고 자세반사(postural reflex) 장애 중 최소한 2가지 이상의 징후를 가지며 이중 하나는 안정시 진전 혹은 서동이 있어야 한다. ② 병력 및 다른 약물, 화합물, 독성물질 등 이차적 원인에 의한 가능성이 배제되어야 한다. ③ 뇌전산화단층촬영 또는 자기공명영상촬영에서 이차성 파킨슨증의 증거가 없어야 한다. ④ 이학적 검사상 뚜렷한 안구운동 장애, 소뇌 징후, 성대마비, 기립성 저혈압, 추체로 증상, 그리고 근위축성 (amyotrophy) 소견은 없어야 한다. ⑤ levodopa 치료에 뚜렷한 호전이 있어야 한다. ⑥ 채취 가능한 범위 내에서 가족력상 PD 또는 PD와 유사한 증상을 보인 사람이 없어야 한다. PD군은 이들 진단기준에 만족된 특발성 파킨슨병 환자 중 발병연령이 50세 이상인 환자 69명(남자 31명, 여자 38명)을 대상으로 하였으며 이들의 평균연령은 62.3세였고 이환기간은 6개월에서 10년이었다. 대조군은 신경학 검사상 특이 소견이 없는 정상인 41명(남자 20명, 여자 21명)을 대상으로 하였고 이들의 평균 연령은 62.2세로 PD군과는 유의한 차이가 없었다. 대조군과 PD군 모두에서 DNA분리를 위해 말초혈액 10/㎖을 채취하였고 DNA분리때 까지 -20℃ 이하에서 냉동보관 하였다.

2. DNA의 분리

혈액 1/㎖를 3/㎖의 lysis buffer(155/mM NH_4Cl, 10/mM $KHCO_3$, 0.1/mM EDTA)와 섞어 15분간 얼음에 방치하면서 간헐적으로 흔들어서 혈구의 파괴를 유도한 후 2,500/×*g*으로 원심하여 침전물을 얻었다. 침전물에는 혈액과 같은 양의 SE 용액(75/mM NaCl, 25/mM EDTA), RNase (20/㎍/㎖), SDS (0.5%, w/v)를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 진탕한 후 다시 proteinase K(100/㎍/㎖)를 첨가하여 50℃에서 3시간 동안 진탕하였다. 용액에서 단백질과 지방질을 제거하기 위해 phenol 과 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 혼합체(25:24:1)로 각각 1회씩 extraction하였고 부피의 10%에 해당하는 3 M sodium acetate(pH 5.2)와 2.5 배의 알콜을 첨가하여 -20℃에서 30분간 보관 후 12,000/×*g*에서 10분간 원심하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% 알콜로 세척하고 건조한 후 적량의 TE에 부유하였다.

3. PCR용 primers

MAO-B 유전자의 PCR 증폭을 위하여 다음과 같은 primer를 사용하였다.

sense primer

5 ' ATTGGCCTCATAGACTTAG 3 '

antisense primer

5 ' GAAGCATCGAAGTTAGGAGT 3 '

CYP2D6 유전자의 mutation을 확인하기 위해서는 아래의 primer를 이용하였다.

primer C(sense)

5 ' GCCTTCGCCAACCACTCCG 3 '

primer D(antisense)

5 ' AAATCCTGCTCTTCCGAGGC 3 '

primer E(sense)

5 ' GATGAGCTGCTAACTGAGCCC 3 '

primer F(antisense)

5 ' CCGAGAGCATACTCGGGAC 3 '

4. PCR 증폭과 반응물의 농축

PCR은 5pmole의 primer, 0.5/㎕의 10/mM dNTP, 0.2/㎕의 Taq polymerase, 0.8/㎕의 genomic DNA (100 pmole)를 총 반응량(reaction volume) 40㎕로 하고 mineral oil로 중첩한 후 95℃, 52℃, 72℃에서 각각 1분간 35 cycles로 증폭하였다. 반응이 끝난 후 mineral oil을 제거하고 반응산물에 butanol 360㎕를 첨가하고 -20℃에서 30분간 냉동보관 후 12,000×g에서 15분간 원심하여 DNA를 침전하였다. Pellet은 70% 알콜로 씻은 후 7/㎕에 부유하고 2/㎕는 1% agarose gel 상에서 반응 생성물을 확인하고 나머지 5/㎕에는 98% formamide, 20/mM EDTA, 0.25/mM NaOH, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol 용액 3/㎕와 섞어 90℃에서 2분간 처리한 후 냉동보관 하였다.

5. PCR 산물의 cloning과 bacterial transformation

PCR 증폭산물은 정제 후 1/㎕, TA cloning vector 2/㎕, 10×ligation buffer 1/㎕를 섞고 T4 DNA ligase 2.5unit을 첨가하여 14℃에서 밤새 반응시켰다. Trans-formation을 위해 DH5α colony 한 개를 2/㎖의 LB에 접종하고 37℃에서 밤새 배양하였다. 다음날 배양된 DH5α 0.5/㎖를 다시 50/㎖의 LB에 접종하고 2-3시간 배양한 후 5/㎖의 차가운 0.1/M $CaCl_2$로 씻고 다시 0.5/㎖의 0.1/M $CaCl_2$에 부유하여 competent cell을 만들었다. 100/㎕의 competent bacterial cell에 2/㎕의 ligation 산물을 섞고 얼음에 30분간 방치하였다. 이 후 42℃에서 1분간 열처리하고 다시 1/㎖의 LB를 첨가하고 37℃에서 1시간 배양하였다. 1시간 후 1.1/㎖의 transformant는 ampicillin(70㎍/㎖)을 첨가한 배양접시에 50/㎕, 200/㎕씩 분주하고 37℃에서 밤새 배양하였다.

6. Transformant에서 plasmid DNA의 분리와 DNA 염기서열 분석

Plasmid DNA를 분리하기 위하여 각 transformant당 12개의 colony를 취하여 3/㎖의 LB에 밤새 배양하였다. 다음날 3/㎖의 배양액 중 1.5/㎖을 eppendorf tube에 옮겨 넣고 12,000/×*g*에서 5분간 원심하여 bacterial pellet을 얻었다. Pellet은 100/㎕의 세포 부유 용액(10/mM Tris, 1/mM EDTA, 10/㎍/㎖ RNase)에 부유하고 다시 100/㎕의 세포 분해 용액(0.2/M NaOH, 1% SDS)을 첨가하고 상온에서 5분간 방치하여 세포를 분해하였다. 위의 용액에 100/㎕의 중화 용액(1.32/M potassium acetate, pH 4.8)을 첨가한 후 12,000/×*g*에서 10분간 원심하여 plasmid DNA를 세포막과 genomic chromosome등으로부터 분리하였다. 상층액에는 2배 알콜을 첨가하고 다시 12,000/×*g*에서 10분간 원심하여 plasmid DNA를 침전하였다. Pellet 즉 plasmid DNA는 70% 알콜로 씻은 후 공기건조시켰다.

7. 제한효소를 이용한 subcloning의 확인과 염기서열 분석

위의 alkaline lysis miniprep법을 이용하여 얻은 plasmid DNA는 제한효소 Eco RI을 이용하여 PCR 증폭산물의 cloning을 확인하고 USB의 DNA sequencing kit(ver 2.0)를 이용하여 제조회사에서 추천하는 방법으로 염기서열을 확인하였다.

8. 전기영동 및 염색

MAO-B 유전자에 대한 PCR 산물의 전기영동은 10% acrylamide gel을 이용하고 gel을 부을 때 한쪽 유리판에는 접착용액(binding solution)을 처리하였다. 영동이 끝난 후 유리판에 붙어있는 gel은 10% acetic acid용액에서 15분간 고정하고 이차 증류수로 3회 씻고 0.1% (w/v) silver nitrate, 0.13/M formaldehyde 용액에서 30분간 염색한 후 다시 2차 증류수로 씻었다. Gel은

3% sodium carbonate, 0.15% formaldehyde 용액에서 발색하고 띠(band)가 보이기 시작하면 10% acetic acid를 가하여 반응을 정지시켰다.

9. CYP2D6에서 RFLP의 확인

Primer pairs C/D와 E/F로 증폭된 DNA는 위에 기술한 방법으로 정제, 농축한 후 primer pairs C/D로 증폭한 경우는 제한 효소 Bst I으로, primer pairs C/D로 증폭한 경우는 제한효소 Hpa II를 사용하여 절단하고 반응산물은 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하였다.

10. 통계처리

통계처리는 SPSS(statistical package for social science) 7.5 version을 이용하였고 비교위험도는 Cornfield 방법으로 구하였고 Chi square 방법으로 비율 검정을 하였다.

결 과

1. MAO-B 유전자의 다형성의 확인

PD군에서 MAO-B 유전자의 이염기 반복에 대한 다형성을 확인하기 위하여 환자의 혈액에서 분리한 DNA는 본 유전자의 intron 2에 부착하는 primer 쌍으로 이염기 반복부분을 PCR 증폭을 하였다. 증폭산물은 정제 후 polyacrylamide gel에서 전기영동하고 silver stainig으로 염색하였다. 각 환자에서 이염기의 반복을 보다 선명히 보기 위해 증폭산물은 formamide와 NaOH로써 변성시키고 전기영동시 8M의 urea를 섞어 전기영동 동안 변성 상태를 유지토록 하였다. 이러한 변성 상태의 전기영동은 MAO-B 유전자는 X 염색체상에 있고, 또한 각 strand의 염기조성(base composition)의 차이에 의한 밀도의 차이로 인하여 동형접합체(homozygote)인 경우 두 개의 띠를 나타내고 이형접합체(heterozygote)인 경우 네개의 띠가 나타날 것으로 기대되었다. 이러한 방법으로 전체 110명(PD군 69, 대조군 41명)의 DNA 시료를 분석하였으며, Fig. 1에서는 그중 9명에 대한 자료를 보여주고 있다. 여자환자의 혈액 DNA의 증폭산물인 lane 2, 3, 4에서는 각각 4개의 띠가 나타났으므로 이에 해당하는 환자는 intron 2에 대해 이형접합체임을 알 수 있고 lane 5, 7, 8, 9, 10, 11은 2개의 띠만 나타났으므로 반접합체(hemizygote)인 남자환자 혹은 동형접합체인 여자환자임을 알 수 있었다. 그러나 본 전기영동으로써는 증폭산물의 정확한 길이를 알 수가 없으므로 환자군의 일부에 대한 염기서열 분석을 실시하였다.

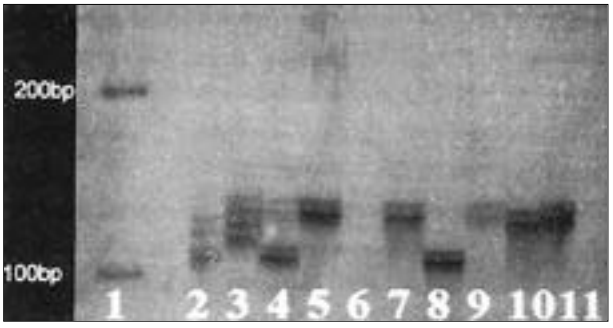

Figure 1. *Acrylamide gel electrophoresis and silver staining of PCR-amplified fragments in intron 2 of human MAO-B gene. Lane 1 contains molecular markers with sizes given in base pairs to the left. Lane 2 to 11 contain each different sizes of fragments. Lane 2,3, and 4 reveal two bands of heterozygote for alleles of females. Lane 5,7,8,9,10, and 11 contain products from hemizygote of males or homozygote of females.*

2. 반복성 이염기의 수의 확인

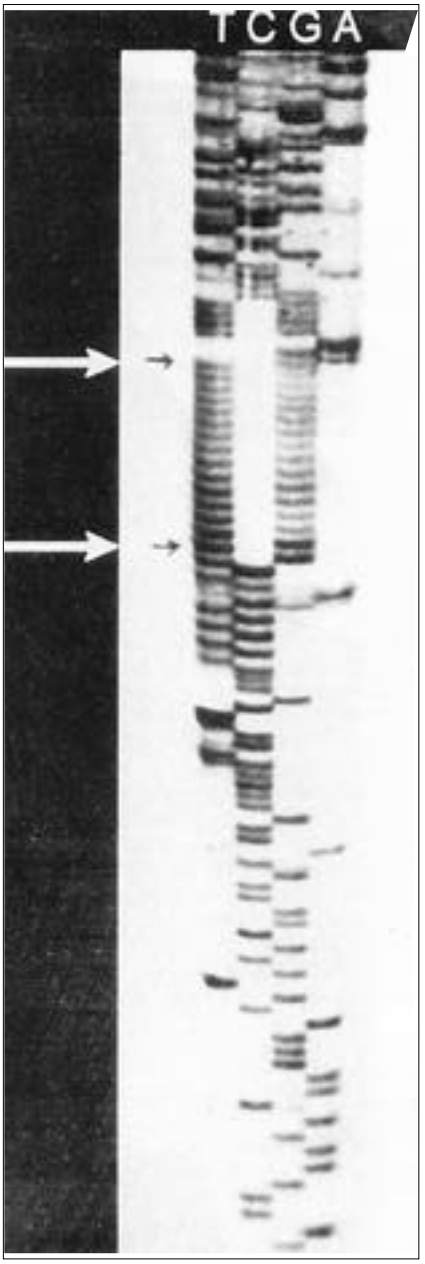

Figure 2. *Sequencing analysis of 162bp PCR-amplified fragment in intron 2 of human MAO-B gene. Lane 1 to 4 contain products of T,C,G, and A termination, respectively and reveal 15 GT repetition between arrows.*

PD군과 대조군의 혈액에서 추출한 DNA의 증폭산물에서 위와 같은 다형성을 확인하였으므로 증폭산물의 크기와 GT의 정확한 반복회수를 확인하기 위하여 PCR 증폭산물은 TA cloning vector (In vitrogen)에 삽입하고 T7 혹은 M13 reverse primer를 사용하여 증폭산물의 염기서열을 분석하였다. 이 중 한 정상인의 염기서열 분석 결과는 Fig. 2에 나타나 있으며 162 bp의 PCR 증폭산물은 $(GT)_{15}$에 해당함을 알 수 있었다. 본 염기서열의 분석과 Fig. 1에서 얻은 다양성의 유형을 비교하여 PCR 증폭에서 가장 작은 편절을 나타낸 160 bp는 $(GT)_{14}$에 해당함을 알 수 있었고 이와 마찬가지로 162 bp는 $(GT)_{15}$, 164 bp는 $(GT)_{16}$, 166 bp는 $(GT)_{17}$, 168 bp는 $(GT)_{18}$, 170 bp는 $(GT)_{19}$, 172 bp는 $(GT)_{20}$, 174 bp는 $(GT)_{21}$에 해당함을 알 수 있었다. 이러한 실험으로 전체 69명의 PD군과 41명의 대조군에서 $(GT)_{14}$에서 $(GT)_{21}$에 해당하는 총 8종의 대립형질이 발견되었다. 이들의 발현 빈도는 대조군에서는 양극현상을 보여서 $(GT)_{14}$와 $(GT)_{19}$가 각각 22.6%와 24.2%로써 가장 높았으나 이에 반해 PD군에서는 $(GT)_{20}$가 47.7%로써 가장 높은 빈도를 보였으며 $(GT)_{14}$는 발견되지 않아서 양극 현상은 보이지 않았다. 이들 각 빈도에 대한 비교위험도(odds ratio) 또한 양극현상을 보여서 $(GT)_{16}$ 형질과$(GT)_{20}$ 형질은 PD군이 대조군에 비해 각각 4.93배(95% confidence interval 0.60-107.63)와 6.15배(95% confidence interval 2.52-15.51)로 나타나서 이들 형질을 가진 사람에 있어서 발병율이 높음을 알 수 있었으며 이중 $(GT)_{20}$ 형질과 PD는 유의한 상관관계가 있었다($p<0.001$). 그러나 상대적으로 $(GT)_{15}$와 $(GT)_{21}$ 형질(비교위험도 1.44와 1.01)을 제외한 다른 형질에서는 최저 0.00에서 최고 0.59의 분포를 보이고 있어서 이들 형질을 가진사람에 있어서는 발병율이 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 본 실험의 결과는 Table 1에 요약하였다.

3. CYP2D6 유전자의 다형성 조사

CYP2D6의 다형성을 조사하기 위하여 첫째, exon 3에 반응(anneal)하는 primer C(5' GCCTTCGC-CAACCACT CCG 3')와 intron 4에 반응하는 primer D(5' AAATCCTGCTCTTCCGAGGC 3')를 이용하여 PCR증폭(PCR 1) 하였고 둘째, exon 5에 반응하는 primer E(5' GATGAG CTGCTAACTGAGCCC 3')와 intron 5에 반응하는 primer F(5' CCGAGAGCATAC TCGGGAC 3')를 이용하여 이의 splice junction을 PCR 증폭(PCR 2)하였다. PCR 1에서는 대조군과 PD군 모두에서 334 bp의 증폭산물을 얻었으며(Fig. 3, lane 1, 3), PCR 2에서는 268 bp 편절(Fig. 3, lane 6, 8)이 증폭되었다. 이들 증폭산물의 다형성을 조사하기 위하여 본 증폭산물은 위에 언급한 방법으로 정제한 후 제한효소 Bam HI의 isoschizomer인 Bst I(인식염기서열: GGATCC)과 Hpa II로써 각각 절단하였다. 제한효소 반응산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 결과 PCR 1의 증폭산물 334 bp 편절은 대조군과 PD군 모두에서 230 bp와 150 bp로

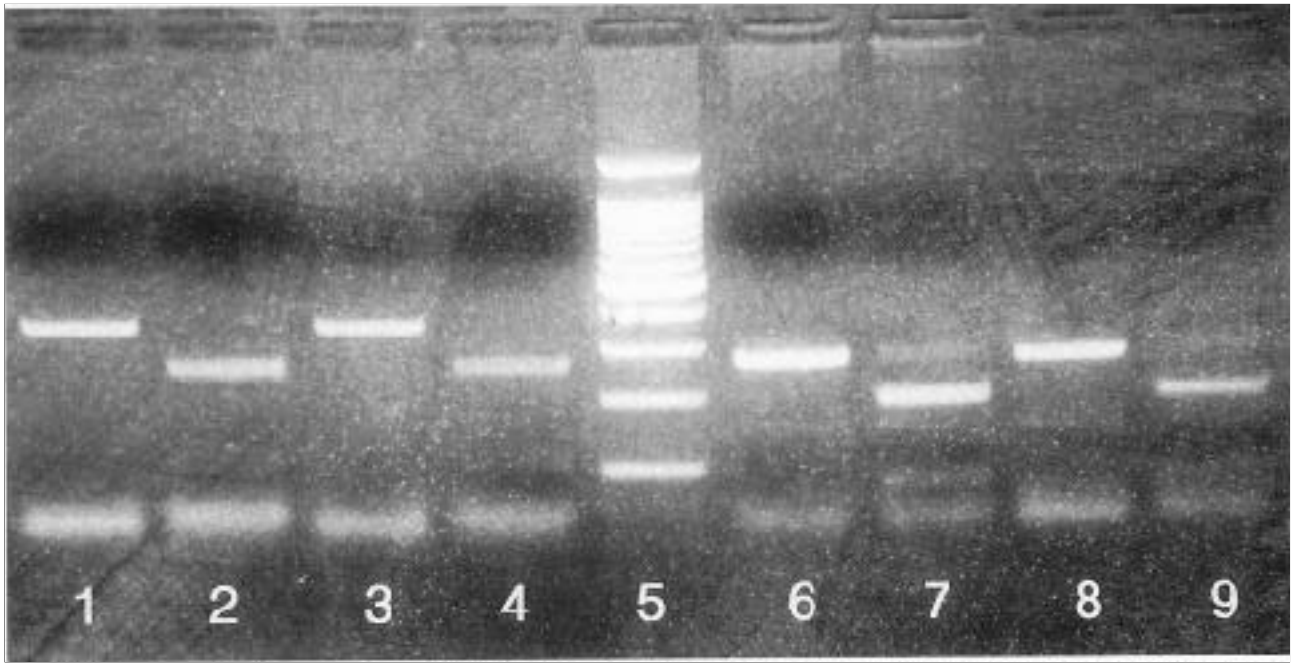

Figure 3. *Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of PCR amplified fragments from CYP2D6 gene. The gene was amplified with primer pairs of C/D(lane 1-4) and primer pairs of E/F(lane 6-9) before and after digestion by restriction enzyme Bst I and Hpa II,respectively. Lane 1 and 3 contain one band of PCR-amplified fragment of control and PD. Lane 2 and 4 contain two bands of PCR-amplified fragments of control and PD after digestion by Bst I. Lane 5 contains molecular size markers. Lane 6 and 8 contain one band of PCR-amplified fragment of control and PD. Lane 7 and 9 contain two bands of PCR-amplified fragments of control and PD after digestion by Hpa II.*

Table 1. Frequencies of each allele in the control and PD groups and odds ratios between control and PD groups

Allele	Control	PD	Odds ratio	CI	P value
160(14)	0.226	0	0.00	0.00<OR<0.17	0.0000013
162(15)	0.081	0.112	1.44	0.44<OR<4.97	0.6958625
164(16)	0.016	0.075	4.93	0.60<OR<107.63	0.2002843
166(17)	0.113	0.047	0.39	0.10<OR<1.44	0.1923833
168(18)	0.129	0.065	0.47	0.14<OR<1.53	0.2623782
170(19)	0.242	0.159	0.59	0.25<OR<1.38	0.2607872
172(20)	0.129	0.477	6.15	2.52<OR<15.51	0.0000108
174(21)	0.065	0.065	1.01	0.25<OR<4.34	0.7637663

PD : Patients with Parkinson's disease
( ) : Numbers of GT repeat
CI : Confidence Interval

(Fig. 3, lane 2, 4) 나타났으며, PCR 2의 증폭산물 268 bp도 대조군과 PD군 모두에서 188 bp와 82 bp(Fig. 3, lane 7, 9)로 나타났다. 이 결과 exon 3과 intron 4 사이와 exon 5와 intron 5 사이의 DNA에는 다형성은 발견되지 않았으며 대조군과 PD군에서도 차이는 없었다.

고 찰

가계연구와 쌍생아 연구 등을 통하여 PD가 유전적 감수성이 있는 질환임[2,5]은 알 수 있으나 많은 수의 구성원이 PD에 이환된 가계의 수가 극히 적다는 점, 유전의 투과도(penetrance)가 낮은 점, 한 개 이상의 유전자가 관여될 것이라는 점 등은 PD의 유전자를 발견해내는 작업을 매우 어렵게 하고 있다.[21] 또한 역학적 조사는 PD의 원인으로써 환경적 요인이 관여 될 것임을 시사하며,[6] MPTP와 같은 외인성 물질이 SN의 도파민 신경세포를 선택적으로 파괴시킬 수 있다는 사실이 알려짐으로 인하여 PD의 원인으로서 환경적 요인을 고려하지 않을 수 없게 되었다.[25] 그러나 MPTP를 복용한 사람 중 적은 수만 PD를 일으킴으로 MPTP를 비롯한 환경적인 요인에 대한 유전적 소인 혹은 감수성 또한 중요할 것으로 생각된다.

이와 같은 질환의 유전적 감수성을 조사하기 위한 방법으로 특정 질환과의 관계가 깊다고 의심되는 물질의 유전자 즉, 후보 유전자를 조사하여 특정한 부위의 유전자 다형성을 갖는 대립유전자의 빈도가 특정 질환에서 대조군보다 높은 빈도를 보이는지를 조사하는 대립유전자 빈도조사가 사용되어 진다.[20,24] 이 연구에서는 PD의 병태생리에 관여할 것으로 추측되는 많은 후보 유전자 중에서 특히 MPTP의 독성작용과 관계 깊은 것으로 알려진 MAO-B 유전자와 CYP2D6 유전자의 대립유전자 다형성의 빈도를 조사하였다.

Konradi et al.[26]은 MAO-B 유전자의 intron 2에서 GT 염기서열 반복의 수가 매우 다양함을 보고하였으며 이러한 유전자 다형성이 MAO-B 효소의 활성도를 변화시키고 이로 인하여 어떤 병리적 과정에 대한 감수성의 차이가 날 것이라고 하였다. 이들은 정상 백인 48명에서 intron 2를 PCR법을 이용하여 172/bp에서 184/bp까지 7개의 다른 대립유전자를 관찰하였다. 그러나 이 연구에서는 이들이 사용한 방법과 동일한 방법으로 intron 2의 PCR산물을 acrylamide gel에 전기영동하여 160/bp에서 174/bp에 걸쳐 8종의 대립유전자를 발견함으로써 Konradi et al.의 소견과 차이를 보여 인종에 따른 MAO-B 유전자의 구조가 다름을 시사하였다. MAO-B 유전자의 인종간의 차이점에 관하여는 Morimoto et al.[27] 또한 MAO-B 유전자의 intron 13을 PCR과 single-stranded conformational polymorphism(SSCP) 법을 이용하여 분석한 결과 일본인은 MAO-B 유전자에 있어서 백인과는 대립유전자의 분포가 상이함을 관찰하였다. 이 연구에서 MAO-B 유전자의 intron 2에서 GT반복의 수가 PD군과 정상 대조군에서 차이를 보임으로 MAO-B 유전자 부위와 PD는 서로 관계가 있을 것으로 보인다. 이미 언급한 바와 같이 MAO-B 유전자의 intron 2 이외의 다른 부위에서도 PD와 유관한 대립유전자가 관찰 될 수 있을 것으로 생각된다. 최근 Kurth et al.[22]은 유럽인으로 이루어진 PD와 대조군의 intron 13을 PCR-SSCP 분석하여 PD와 대조군의 대립유전자가 다른 분포를 보임을 관찰하였고 변이된 MAO-B 유전자가 PD의 유전적 감수성을 높일 수 있을 가능성을 시사하였다. 그러나 일본인을 대상으로 같은 방법으로 시행한 Morimoto et al.[27]의 연구에서는 PD와 대조군에서 비슷한 대립유전자의 분포를 보여 PD에서의 MAO-B 유전자의 변이가 인종간의 차이를 보일 수도 있음을 시사하였다. 한편 Ho et al.[28]은 MAO-B 유전자의 intron 13을 Kurth et al.[22]이 기술한 방법으로 PCR한 후 이를 sequencing하여 A와 G의 단염기 다형성이 있음을 발견하고 대립유전자에서 이것을 조사하였으나 PD군에서 A 대립유전자가 다소 많지만 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다고 하였다. 그러나 Costa et al.[29]은 동일한 조사를 하여 G 대립유전자의 빈도가 PD에서 유의하게 높다고 하여 Ho et al.[28]과는 상반된 결과를 보고하였다. 역학 조사는 흡연자들에게서 PD의 발병율이 낮은 것으로 보고하고 있는데[30] Fowler et al.[31]은 흡연자들의 뇌에서 MAO-B 활성도가 비흡연자들 보다 40% 감소되어 있음을 관찰하고 흡연이 MAO-B 활성도를 저하시켜 PD에 대한 감수성을 감소시킬 것이라고 추론하였다. 또한 deprenyl(selegiline)에 의한 MAO-B 억제가 도파민 신경

세포 손상과 죽음을 감소시켜 PD의 진행을 방지할 수 있는 것으로 알려져 있다.[32] 이러한 결과들을 종합하여 보면 MAO-B 유전자의 다형성은 인종간의 차이를 보일 수 있으며 PD에 대한 유전적 감수성에 다소 관여할 것으로 보이며 적어도 한국인의 PD에서는 유전적 감수성을 높이는데 상당한 기여를 할 것으로 생각된다.

사이토크롬 P450은 스테로이드, 지방산, 생물학적 아민, 다양한 약제들, 화학적 발암물질, 돌연변이 유발물질(mutagen), 기타 환경 공해물질 등 수많은 물질들의 산화성(oxidative) 대사에 관여하는 효소들이다.[33] 이 중 사이토크롬 P450IID6의 기능장애로 인한 debrisoquine과 sparteine의 대사 이상은 인간에서 산화적 약물대사의 유전적 이상의 대표적인 예로서 광범위하게 연구되어 왔다. 사이토크롬 P450IID6의 기능에 따라 두 개의 뚜렷한 표현형(phenotype)이 관찰되는 바 EM과 PM이다.[16] PM은 debrisoquine을 효율적으로 대사시키지 못하여 대사물인 4-hydroxy debrisoquine을 EM보다 10-200배 낮게 소변으로 배출시킨다. PM은 debrisoquine 뿐만 아니라 MPTP를 비롯한 20개 이상의 약물에 대한 대사장애를 보이며 이들 약물 뿐 만 아니라 다른 약물에 대하여도 약물로 인한 부작용을 경험할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다.[17] PD가 MPTP와 같은 신경 독성물질에 의하여 발생할 수 있음이 발견되고 사이토크롬 P450IID6가 MPTP 대사에 관련된다는 사실이 알려진 이래 PD 에서 PM의 발생율이 높을 것이라는 가설이 제시되었다.[15,34] 그러나 PD에서 PM의 빈도에 관한 연구들은 상충되는 결과를 제공하였으며 이는 연구대상 집단의 크기 뿐 만 아니라 약물역동에 관여하는 여러 가지 변인에 의한 한계 때문으로 생각되어진다.[35-36] 그러나 이러한 한계는 P450IID6 유전자를 직접 분석함으로써 극복될 수 있을 것으로 기대되어진다.[37] PM은 사이토크롬 P450IID6의 유전자인 CYP2D6 유전자의 변이에 의하여 표현되며 현재까지 CYP2D6A, CYP2D6B, CYP2D6C, CYP2D6D, CYP2D6E, CYP2D6L, CYP2D6T 등 여러 종류의 변이유전자가 알려져 있다.[18,38] 이 연구에서는 이러한 변이유전자 중 그 빈도가 가장 높다고 알려진 CYP2D6A와 CYP2D6B 변이유전자와 PD와의 관계를 조사하였다. CYP2D6A는 CYP2D6유전자의 exon 5의 단염기 결손 변이유전자이며 CYP2D6B 는 CYP2D6 유전자의 intron 3 과 exon 4 연결 부위의 염기서열에서 G가 A로 치환된 변이 이다. CYP2D6B는 PM의 80% 이상을 점하고 있으며 PD에서 대조군보다 약 두 배 가량 높은 빈도를 보임으로 PD의 유전적 감수성과 유관한 것으로 보는 연구들이 있다.[18-19,24] 그러나 다른 연구들에서는 PD에서 CYP2D6B의 빈도가 대조군과 차이가 없었다.[23,36] 이와 같이 CYP2D6B 유전자와 PD와의 관계에 관한 연구들이 일관성이 없는 결과를 보이는 점은 연구대상의 수가 적어서 통계적 힘(statistical power)을 약화시키는 것도 중요한 원인으로 고려될 수 있으므로 향후 보다 많은 수를 대상으로 연구를 진행할 필요가 있다. McCann et al.[24]은 현재까지 발표된 10개의 연구들의 결과들을 초분석(meta-analysis)하여 PD에서 PM의 빈도와 CYP2D6B 유전자의 빈도가 유의하게 높다고 보고하면서 PD와 CYP2D6B간에 원인적 관계가 있을 것으로 추정하였다. 또한 PD의 진단기준이 연구자들 간에 일치하지 않은 점과, 일치하더라도 임상진단 자체의 정확도가 낮은 점도 중요한 원인이 될 수 있는데 Hughes et al.[39]은 임상적으로 진단된 PD 환자의 약 20%의 환자에서 부검소견 상 PD와는 다른 병리소견을 보인다고 하였다. 저자는 PD의 진단의 정확도를 높이기 위하여 Ward and Gibb[40]이나 Calne et al.[41]이 제안한 진단기준 보다 더욱 엄격한 기준을 설정하여 이러한 문제점을 해결하려고 노력하였다. 또한 인종간의 차이도 대단히 중요한 요인이 될 것으로 생각되는데 PM의 빈도가 백인은 3.2-11.5% 정도로 다양하며 일본인은 1% 정도로 서구인들에 비하여 매우 낮은 것으로 보고되어 있다.[35,42] 이와 관련하여 PD 유병율에 대한 한국에서의 역학조사가 없으나 한국인과 비슷한 일본인에서 서구인에 비하여 두배 가량 유병율이 낮은 점을 고려한다면 한국에서도 PD의 유병율이 서구보다 낮을 것으로 추정된다. 이 연구에서 CYP2D6B 변이 유전자가 정상대조군과 PD에서 발견되지 않은 점은 인종간의 차이에 따른 것으로 설명될 수 있겠다.

결 론

MAO-B는 PD를 일으키는 외인성 물질인 MPTP를 대사시켜 신경 독성물질인 MPP^+를 산생시키며 MPP^+는 SN의 도파민 신경세포를 선택적으로 파괴시켜 PD를 일으키는 것으로 밝혀져 있다. 또한 DH는 각종 내인성 물질 뿐만 아니라 MPTP와 MPP^+ 등 외인성 물질을 대사시켜 해독작용을 하는 주된 효소이므로 저자는 이들 효소들의 유전자 다형성과 PD와의 원인적 관계를 알아보기 위하여 이 연구를 시행하였다.

MAO-B유전자에서는 intron 2를 PCR 증폭하여 acrylamide gel에서 전기영동하여 다형성을 관찰하였고 CYP2D6 유전자는 intron 3과 exon 4 부위와 exon 5를 PCR 증폭하고 제한효소 처리 후 agarose gel에 전기영동하여 CYP2D6A와 CYP2D6B의 변이 유전자를 관찰하였다. 결과는 MAO-B 유전자의 intron 2는 (GT) 염기반복서열의 수에 따라 160 bp에서 174 bp까지 8종의 대립유전자를 보였으며 대조군에서는 160/bp와 170/bp에서 높게 나타났고 PD에서는 172 bp의 빈도가 가장 높았으며 대조군과 비교하여 6.15배의 비교위험도(95% confidence interval 2.52-15.51)를 보여 172/bp와 PD와는 유의한 상관관계가 있었다($p<0.001$). 대조군과 PD군 모두에서 CYP2D6의 변이 유전자를 관찰할 수 없었다.

결론적으로 이 연구에서는 MAO-B 유전자의 다형성은 한국인에서 PD의 감수성에 관여하는 것으로 간주되나 CYP2D6 유전자는 한국인 PD에서 다형성이 관찰되지 않았다.

REFERENCES

1. Gibb W. *The pathology of parkinsonian disorders.* In: Quinn N, Jenner P, eds. Disorders of movement. London: Academic press, 1989; 33-57.
2. Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990; 27: 276-282.
3. Vieregge P, Heberlein I. Increased risk of Parkinson's disease in relatives of patients. *Ann Neurol* 1995; 37: 685.
4. Ward CD, Duvoisin RC, INce SE, Nutt JD, Eldridge R, Calne DB. Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology* 1983; 33: 815-824.
5. Johnson WG, Hodge SE, Duvoisin R. Twin studies and the genetics of Parkinson's disease- a reappraisal. *Mov Disord* 1990; 5: 187-194.
6. Tanner CM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 1992; 10: 317-329.
7. Seidler A, Hellengrend W, Robra B-P, et al. Possible environmental, occupational and other ecological factors for Parkinson's disease: a case control study in Germany. *Neurology* 1996; 46: 1275-1284.
8. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.
9. Ohta S, Tachikawa O, Makino Y, Tasaki Y, Hirobe M. Metabolism and brain accumulation of tetrahydroisoquinoline(TIQ), a possible parkinsonism inducing substance, in an animal model of a poor debrisoquine metabolizer. *Life Sci* 1990; 46: 599-605.
10. Schapira AHV, Cooper JM, Deaxter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823-27.
11. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32: 804-812.
12. Hsu YPP, Powell JF, Sims RB, Breakefield XO. Molecular genetics of the monoamine oxidases. J *Neurochem* 1989; 53: 12-18.
13. Fonne-Pfister R, Eyer UA. Xenobiotic and endobiotic inhibitors of cytochrome P-450dbl function, the target of the debrisoquine/sparteine type polymorphism. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3829-3835.
14. Allard P, Rinne J, Marcusson JO. Dopamine uptake sites in Parkinson's disease and in dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 1994; 637: 262-266.
15. Barbeau A, Cloutier T, Roy M, Plasse L, Paris S, Poirier J. Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *Lancet* 1985; 8466: 1213-1216.
16. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancester R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977; ii: 584-586.
17. Brosen K, Gram LF. Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36: 537-547.
18. Armstrong M, Daly AK, Cholerton S, Bateman DN, Idle JR. Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* 1992; 339: 1017-1018.
19. Smith CAD, Gough AC, Leigh PN, et al. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 1992; 339: 1375-1377.
20. Marcadet A, Gebehrer L, Betuel H, et al. DNA polymorphisms related to HLA-DR2 DW2 in patients with narcolepsy. *Immunogenetics* 1985; 22: 679-683.
21. Gasser T, Wszolek ZK, Trofatter J, et al. Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidate genes. *Ann Neurol* 1994; 36: 387-396.
22. Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1993; 33: 368-372.
23. Diederich N, Hilger C, Goetz C, Vieregge P, Metz H. Genetic variability of the CYP2D6 gene is not a risk factor for sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996; 40: 463-465.
24. McCann SJ, Pond SM, James KM, Couteur DGL. The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *J Neurol Sci* 1997; 153: 50-53.
25. Calne DB, Langston JW. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 1983; 24/31: 1457-1459.
26. Konradi C, Ozelius L, Breakefield XO. Highly polymorphic (GT)n repeat sequence in intron II of the human MAO-B gene. *Genomics* 1992; 12: 176-177.
27. Morimoto Y, Murayama N, Kuwano A, Kondo I, Yamashita Y, Mizuno Y. Association analysis of a polymorphism of the monoamine oxidase B gene with Parkinson's disease in a Japanese population. *Am J Med Genet* 1995; 60: 570-572.
28. Ho SL, Kapadi AL, Ramsden DB, Williams AC. An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995; 37: 403-405.
29. Costa P, Checkoway H, Levy D, et al. Association of a polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with Parkinson's disease. *Am J Med Genet* 1997; 74: 154-156.
30. Sasco AJ, Paffenbarger RS. Smoking and Parkinson's disease. *Epidemiology* 1990; 1: 460-465.
31. Fowler JS, Volkow ND, Wang G-J, et al. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature* 1996; 379: 733-736.
32. Parkinson Study Group. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1993; 328; 176-183.
33. Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 945-993.
34. Coleman T, Ellis SW, Martin IJ, Lennard MS, Tucker GT. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and

3A4-implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 685-690.

35. Alvan G, Bechtel P, Iselius L, Gundert-Remy U. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 39: 533-537.
36. Ağndes JAG, Jim nez FJ, Luengo A. Association between the oxidative polymorphism and early onset of Parkinson's disease. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 291-298.
37. Gough AC, Smith CA, Howell SM, Wolf CR, Bryant SP, Spurr NK. Localisation of the CYP2D6 gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 1993; 15: 430-432.
38. Tsuneoka Y, Matsuo Y, Iwahashi K, Takeuchi H, Ichikawa Y. A novel cytochrome P-450IID6 mutant gene associated with Parkinson's disease. *J Biochem* 1993; 114: 263-266.
39. Hughes A, Daniel S, Kilford L, Lees A. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 181-184.
40. Ward CD, Gibb WRG. Research diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1990; 53: 245-249.
41. Calne DB, Snow BJ, Lee C. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1992; 32: S125-S127.
42. Nakamura K, Goto F, Ray WA, et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquine hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 1985; 38: 402-408.