

가족연구를 통해 *APOA5* 유전자의  
혈중 지질농도에 미치는 영향 분석

연세대학교 대학원

의과학과

최정란

가족연구를 통해 *APOA5* 유전자의  
혈중 지질농도에 미치는 영향 분석

지도교수 장 양 수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학과

최 정 란

# 최정란의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

## 감사의 글

먼저 이 논문의 시작부터 끝까지 아낌없는 지원과 격려를 보내주신 장양수 선생님께 감사드립니다. 바쁘신 중에도 세심한 배려와 넓은 아량으로 이해해주신 점 다시 한번 감사를 드립니다. 논문의 처음 기획 단계부터 기본적인 개념을 이해하는데 세심하게 배려해주신 박현영 선생님께도 감사함을 전합니다. 단지 졸업하기 위한 논문에 그치는 것이 아니라 더 알고자 하는 배움에 대한 열정도 함께 가르쳐주신 선생님께 감사드립니다.

부족함에도 불구하고 좋은 점을 먼저 얘기해주시며 더 알찬 내용으로 만들기 위해 함께 고민해주신 남정모 선생님께도 감사드립니다. 분주함 가운데도 시간을 할애해주시고 논문쓰는 일이 쉬운 일은 아님을 얘기하시며 꼼꼼하고 날카로운 비판도 아끼지 않으셨던 선생님께 학문을 향한 열정을 배웠음을 감히 말씀드립니다. 좋은 웃음과 여유로움으로 연구하는 것이 즐거운 것임을 알게 해주시고 격려와 용기를 보내주신 지선하 선생님과 자상한 배려로 이끌어주신 이진성 선생님께도 감사의 인사를 드립니다. 논문쓰는 일이 지금 아니면 할 수 없는 값진 경험이란 점을 말씀하시며 조언을 주셨던 강대룡 선생님께도 감사드립니다.

더 많은 도움을 주고 싶지만 아직 부족해서 도움이 되지 못한다며 겸손해 했던 혜진씨, 가정일과 연구소의 일을 병행하는 바쁜 시간조차도 쪼개어 통계분석을 위해 애써준 찬미씨, 열정과 활기참으로 격려와 용기를 보내준 진우씨에게 고마움을 전합니다. 작은 것이라도 지원을 아끼지 않은 은정씨와 선영씨, 용기와 응원을 보내준 실험실 식구들 임현정 선생님, 이귀숙 선생님, 이세형 선생님, 진희씨, 늘 격려를 보내주고 있는 상미씨와 윤영이에게도 같이 일할 수 있었음에 감사를 전합니다. 연구에 대한 열정과 세심함을 배울 수 있게 도와준 배영안 박사님, 새로운 아이디어와 창의력으로 실험실 생활을 도와주었던 이경준 선생, 나이는 어리지만 맘 속 얘기까지도 나눌 수 있었던 보경이, 대학원 동기로서 함께 고민하며 학문에 매진할 수 있게 격려해주었던 서윤이와 작은 것이라도 좋은 결과를 위해 술선수 범했던 경욱이에게도 감사함을 전합니다.

문인화라는 또다른 세계의 멋스러움과 기쁨, 매력을 알게 하시고 배움의 열정을 갖게 해주신 스승님, 서로 다른 분야에서 활동하지만 그림을 좋아하는 마음으로 만나는 아연서화실 식구들, 어린 시절부터 치과에 가는 즐거움을 알게 해주시고 정성과 사랑으로 돌보는 의사의 모습을 보여주신 이상필 선생님, 논문쓴다는 핑계

로 소홀했던 다락방 협회 가족들, 잘 할 수 있다는 용기와 자신감을 불어넣어준 서소문 CBMC 회원들, 다른 누구보다도 칭찬과 격려를 아끼지 않고 늘 좋은 면을 얘기해주는 중창단 멤버들에게 고마움을 전합니다. 대학교 때부터 지금까지 한결 같은 응원과 배려, 충고와 애정을 보여준 명교와 지연이, 고등학생 때부터 지금까지 변함없는 성원과 격려를 보내주며 또 다른 도약으로 꿈을 이루어 나가는 나리, 합리적이고 이성적인 생각을 나눌 수 있는 만능재주꾼 수진이, 멀리 독일에서도 응원과 용기를 보내주고 온유함과 여유로움을 배울 수 있게 해 준 효경이, 10대 때부터 여전히 만나면 유쾌하고 서로에게 웃어줄 수 있는 희정이와 현주, 자주 만날 순 없지만 전화로 문자로 용기를 불어넣어준 친구들과 지치고 힘들 때마다 하루에도 몇 번씩이나 말씀으로 힘이 되어준 수진, 제경, 승엽, 진환, 수인이에게도 고맙단 말을 전합니다.

강한 독립심을 갖게 키워주시고 한결 같은 사랑으로 지켜봐 주신 부모님께 이 논문을 드리고 싶습니다. 걱정과 근심만 드린 것 같아 죄송한 마음이지만 그럼에도 불구하고 부족한 딸을 믿어주시고 박사과정까지 공부할 수 있게 지원을 아끼지 않으셨던 부모님께 감사드립니다. 때론 오빠처럼 때론 친구처럼 격려와 칭찬은 물론 따끔한 충고까지도 마다하지 않았던 친구 같은 남동생 필순이와 항상 아름다운 모습과 편안함을 주며 기도로써 지원해주는 희경이에게도 고마움을 보냅니다.

그 무엇보다도 이 모든 과정과정마다 세밀한 것까지 이끌어주시고 가장 좋은 방법과 환경을 만들어주신 하나님께 감사드립니다.

최정란 드림.

## <차 례>

그림 및 표 차례

국문요약 .....	1
<b>I. 서론 .....</b>	<b>3</b>
<b>II. 재료 및 방법 .....</b>	<b>7</b>
1. 연구대상 .....	7
가. 환자-대조군 연구대상자 .....	7
나. 고중성지방혈증 36가계 .....	8
2. 임상측정 .....	10
가. 혈중 지질농도 측정 .....	10
나. 혈당 및 인슐린농도 측정 .....	10
다. 인체계측 .....	10
3. 분석방법 .....	11
가. DNA 염기서열 분석 .....	11
나. <i>APOA5</i> 유전형 분석 .....	11
4. -3A>G 단일염기 다형성의 기능연구 .....	12
5. 통계적인 분석 .....	12
가. 환자-대조군 자료분석 .....	13
나. 가계 자료의 분석 .....	14
<b>III. 결과 .....</b>	<b>15</b>
1. 환자-대조군과 가족자료의 임상적 특징 .....	15
2. <i>APOA5</i> 유전자의 SNP 위치와 DNA 염기서열 분석 결과 .....	18
3. <i>APOA5</i> 유전자에서 linkage disequilibrium 분석 .....	21
4. 환자-대조군 자료의 연관성 분석 .....	23
가. 유전형과 중성지방 농도의 연관성 .....	23

나. Haplotype과 고중성지방혈증과의 연관성 .....	25
다. SNP의 추가에 따른 PDE값의 변화로 tag-SNP 구성 .....	27
5. 가계 자료를 이용한 연관성 분석 .....	32
가. TDT 연구를 통해 나타난 고중성지방혈증 관련성 .....	32
나. 가계 자료에서 나타난 haplotype의 빈도와 TG와의 연관성 분석 .....	32
6. <i>APOA5</i> SNP - 3A>G의 기능적 연구 .....	37
 IV. 고찰 .....	 39
 V. 결론 .....	 44
 참고문헌 .....	 45
 영문요약 .....	 50

## <그림 차례>

그림 1. <i>APOA5</i> 유전자의 구조와 SNP의 위치 .....	19
그림 2. Luciferase assay를 이용한 -3A>G 다형성의 기능적 연구 .....	38

## <표 차례>

표 1. 고중성지방혈증 36개의 가계의 구성형태 .....	9
표 2. 환자군과 대조군의 임상적 특성 .....	16
표 3. 가계 자료의 임상적 특성 .....	17
표 4. 염기서열 분석을 통해 확인한 <i>APOA5</i> 유전자의 SNP 위치와 대립 유전자의 빈도 .....	20
표 5. 환자-대조군 자료에서 linkage disequilibrium .....	22
표 6. 환자-대조군 연구에서 <i>APOA5</i> SNP - 1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, G182C, 1259T>C SNP의 대립인자와 유전형 발생 빈도 .....	24
표 7. EM 방법으로 추정된 haplotype의 빈도와 LRT 결과로 나타난 <i>APOA5</i> 유전자와 고중성지방혈증의 환자-대조군 연관성 검정 .....	26
표 8. SNP의 조합에 따른 PDE .....	29
표 9A. Tag-SNP으로 구성된 haplotype의 빈도와 <i>APOA5</i> 유전자와 고중성지방혈증의 환자-대조군 연관성 검정 .....	30
표 9B. <i>APOA5</i> 유전자의 SNP와 tag-SNP으로 구성된 haplotype으로 고중성지방혈증과의 연관성 분석 .....	31
표 10. 가계 자료를 이용한 <i>APOA5</i> 유전자의 TDT 분석 .....	34
표 11. 가족자료에서 나타난 haplotype 의 빈도와 TG와의 연관성을 분석 한 FBAT 결과 .....	35
표 12. Tag-SNP으로 구성된 haplotype의 FBAT 분석 결과 .....	36



국문요약

가족연구를 통해 *APOA5* 유전자의 혈중 지질농도에 미치는 영향 분석

<지도교수 장양수>

연세대학교 대학원 의과학과

최 정 란

본 연구에서는 환자-대조군 자료와 가계자료를 이용하여 한국인에서 apolipoprotein A-V(*APOA5*) 유전자와 혈중 중성지방(triglyceride, TG) 농도와의 관련성을 알아보려고 하였다. 환자-대조군 연구에 이용한 자료는 39명의 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia, HTG) 환자군과 144명의 대조군이었고 가계 연구에서는 36개의 가계 자료를 대상으로 하여 *APOA5* 유전자내에 있는 단일염기서열 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)으로 구성된 haplotype과 HTG 위험여부와의 연관성을 비교 분석하였다. 48명의 정상인에서 직접 염기서열 분석(sequencing)을 통해 12개의 SNP를 발견했으며 이 중 6개의 SNP -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, G182C, 1259T>C를 선정했다. 환자-대조군 자료에서 연관성 분석을 위해 사용한 통계적 방법은 haplotype에 근거한 우도비 검정법(likelihood ratio test, LRT)과 haplotype trend logistic regression test(HTR)이었고, 가계자료에서는 transmission disequilibrium test(TDT)와 family based association test(FBAT) 방법을 이용하여 연관성을 분석

하였다. 또한 환자-대조군 자료에서 tag-SNP으로 선정된 SNP -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, 1259T>C만을 이용하여 질병 발생과의 관련성을 알아보았다. 환자-대조군 연구에서 -3A>G, G182C 다형성이 대조군보다 환자군에서 더 많은 빈도로 나타났고 HTG와의 위험도에서 유의한 상관성이 있었다( $p<0.01$ ). 총 6개의 SNP로 이루어진 haplotype CGGGTT는 환자군과 대조군에서 TG와 유의적인 상관성을 보였고( $p<0.01$ ), LRT 분석 결과에서도 HTG의 위험도를 높이는 haplotype인 것으로 확인되었다( $p<0.05$ ). Tag-SNP을 이용한 HTR 분석 결과 haplotype CGGT를 가진 사람은 다른 haplotype을 가진 경우보다 HTG의 발생빈도가 14.9배 높은 것으로 나타났다(95% CI 2.8-79.7). 가계 자료를 이용하여 분석한 TDT 결과에서 -1390C>T와 -3A>G SNP가 TG와 통계적인 연관성이 있었고 haplotype TGAGGT가 HTG 위험여부에 유의적인 상관성이 있다는 것을 알 수 있었다( $p<0.01$ ).

---

핵심되는 말 : apolipoprotein A-V, 고중성지방혈증, 혈중 중성지방 농도, 환자-대조군 연구, 가계 연구, tag-SNP

가족연구를 통해 *APOA5* 유전자의 혈중 지질농도에 미치는 영향 분석

<지도교수 장 양 수>

연세대학교 대학원 의과학과

최 정 란

## I. 서론

고중성지방혈증(hypertriglyceridemia, HTG)은 중성지방(triglyceride, TG) 농도의 증가로 인해 관동맥질환(cardiovascular disease, CVD) 발생의 위험요인으로 작용하며 당뇨병과 감염성 질환, 대사성 증후군(metabolic syndrome)과 연관성이 있는 질환으로 알려져 있다.<sup>1</sup> 복합적이고 다인자적인 원인으로 나타나는 질병인 HTG는 알코올과 당뇨병, 비만, 약물투여 등이 관여하는 것으로 알려져 있는데 최근 TG 농도 조절과 대사에 있어 유전적 요인이 작용하는 것으로 보고되었다.<sup>2</sup> TG 활성을 저하시키는 효소로 알려진 lipoprotein lipase(LPL)는 지방세포와 근육에서 발현되고 *APOCII* 유전자에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup> 최근 연구에서 TG 대사와 관련된 또다른 유전자인 *APOCIII*가 LPL 활성화에 비경쟁적 저해제(non-competitive inhibitor)로 작용한다는 것이 밝혀지면서 *APOCIII* 유전자 내의 단일염기서열 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)과 TG 농도 조절에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>4-5</sup> 생화학적 연구와 동물모델을 이용한 연구를 통해 *APOCIII* 유전자는 HTG가 표현형(phenotype)으로

나타나는 가족성 고지혈증(familial combined hyperlipidemia, FCHL) 발생에 관여하는 유전자로 알려졌고 염색체 11q23 위치에 있는 *APOAI/CIII/AIV* gene cluster와 FCHL 발생과의 연관성이 보고되었다.<sup>4</sup>

아포지단백질(apolipoprotein)은 혈장 내에서 지질 운반에 관여하는 지질 바인딩 단백질로써 아포지단백질 구조나 합성의 결함으로 인해 지질 대사에 영향을 주게 된다.<sup>4</sup> 아포지단백질 *APOAI/CIII/AIV* gene cluster의 open-reading frame에서 최근 발견된 apolipoprotein A-V(*APOA5*)는 최저 밀도지단백(very low-density lipoprotein, VLDL)과 유미지립(chylomicron) 형태로 TG의 지방 분해를 자극함으로써 TG 대사에 영향을 주는 것으로 알려졌다.<sup>6-7</sup> 2.5kb 크기인 *APOA5*는 4개의 엑손으로 구성되어 있고 369개의 아미노산으로 코딩되는 유전자로써 *APOA3* 유전자와는 37kb 떨어진 위치에 있고 *APOA4* 유전자에서는 27kb 떨어져 있다.<sup>8-9</sup> 단백질의 길이에서는 사람, 쥐, 조류 각각이 366, 368, 355개의 아미노산으로 구성되어 있어 같은 종에서 396, 394, 366개의 아미노산을 가진 *APOA4* 유전자의 길이보다 짧은 것으로 나타났다.<sup>10</sup> 임상연구를 통해 *APOA5* 유전자가 과발현된 마우스에서 TG 농도가 감소한 반면 knockout된 마우스에서 TG 농도가 4배 높게 나타남으로써 TG 농도를 결정하는데 중요하다고 알려져 있고<sup>11-12</sup> 핵가족과 쌍둥이 연구를 통해 TG 농도가 다양한 인종에서 유전적인 요인에 의해 영향을 받는다는 보고가 있었다.<sup>13</sup> 최근 Pennacchio 등은 *APOA5* 유전자가 TG 대사에 중요한 역할을 한다고 확인했을 뿐 아니라 유전자에서 발견한 SNP(SNP1-3)가 TG 농도조절에 유의적으로 연관되어 있다고 보고했다.<sup>13</sup> 3개의 SNP가 서로 연관(linkage)되어 있어 동일한 haplotype을 구성하는데 관여하고 프로모터 위치에 있는 SNP가 서로 다른 인종에서

TG 농도의 증가와 연관성이 있다는 것을 확인했다.<sup>13</sup> 다양한 인종에서 *APOA5* 유전자의 SNP와 haplotype이 TG 조절에 관여한다고 보고하고 있으나 한국인에서 *APOA5* 유전자의 SNP으로 조합된 haplotype과 TG의 연관성에 대해서는 거의 알려진 바 없었다.<sup>14-18</sup>

지금까지는 주로 유전자의 위치를 탐색하는데 하나의 표지 유전자 (genetic markers) 또는 SNP를 이용하는 방법에 의존해 왔지만 앞으로는 유전체 상에 가깝게 위치한 SNP들의 묶음인 haplotype이 이용될 것으로 예상된다. 이러한 연구 방법의 변화는 단일 유전자 좌위(locus) 정보를 이용한 연쇄분석(linkage analysis) 또는 연관성 분석(association analysis) 보다는 haplotype의 정보를 이용한 분석이 통계적 검정력을 높일 수 있기 때문이다.<sup>19</sup> Haplotype에 기초한 연쇄분석과 연관성 분석을 위해 먼저 각 개체의 haplotype 정보를 알아야 한다. 일반적으로 주어진 자료는 haplotype 대신에 유전형(genotype)이기 때문에 주어진 유전형으로부터 haplotype을 유추하는 과정이 필요하다. 이형 접합체(heterozygote)를 갖는 유전자 좌위 개수가 1개 이하이면 haplotype 짝이 유일하게 결정되지만 2개 이상이면  $2^{l-1}$ ( $l$  : 이형 접합체 유전자 좌위의 개수)개의 가능한 짝이 존재하여 불확실성이 지수적으로 증가한다. 분자 생물학적인 분석 방법을 사용하여 haplotype의 짝을 유추할 수 있는데 이 방법은 비용이 많이 드는 단점이 있기 때문에 통계적 추론을 통해 haplotype을 재구성하는 방법이 사용되고 있다.<sup>19</sup>

본 연구에서는 *APOA5* 유전자와 TG와의 연관성을 밝히고자 환자-대조군 자료와 가계 자료를 동시에 이용하여 두 연구 설계의 단점을 보완하고자 하였다. 환자-대조군 연관성 분석은 환자군, 대조군 및 환자군과 대조

군을 합친 전체 자료에서 각각 haplotype의 빈도를 추정 한 후 우도 함수의 차이를 이용한 우도비 검정법(likelihood ratio test, LRT)과 특정 haplotype의 질병발생에 미치는 영향을 알아보기 위해 haplotype trend logistic regression(HTR) 방법을 이용했다. 가계연구에서는 부/모/자녀로 구성된 가계자료에서 질병이 있는 발단자(proband) 자녀에게 부와 모의 특정 대립인자(allele) 또는 haplotype 중 전달되는 빈도와 전달되지 않는 빈도를 비교하는 transmission disequilibrium test(TDT) 방법을 사용하였다. 또한 *APOA5* 유전자의 haplotype block을 동정할 수 있는 tag-SNP를 찾고 이를 이용하여 연관성 분석을 시도하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구는 2000년부터 2003년까지 연세대학교 심혈관계질환 유전체연구 센터에 내원한 HTG 환자군 39명과 정상대조군 144명, HTG 36가계를 대상으로 선정하였다. 모든 대상자들은 병원에 내원한 의무기록이 있었으며 대학위원회 규정에 따른 임상자료 활용 동의서(written informed consent)를 받은 후 시행하였다.

본 연구에 사용된 자료는 다음과 같다.

- (1) *APOA5* 유전자 전체의 염기서열 분석을 위해 사용했던 48개의 시료
- (2) 환자-대조군 연구를 위한 39명의 고중성지방혈증 환자군(남 : 여=23 : 16), 144명의 대조군(남 : 여=93 : 51)
- (3) 가계 자료 분석에 이용한 고중성지방혈증 36가계

#### 가. 환자-대조군 연구대상자

정상 대조군은 TG 수치가 150mg/dl 이하이고 관동맥질환의 기왕력이 없으면서 고혈압, 당뇨병, 뇌혈관질환, 말초혈관질환이 없으며 이러한 질환의 가족력이 없는 성인으로 심전도상 정상소견을 보이는 경우로 정의하였다. 지질하강제나 호르몬제제를 복용하는 경우는 정상 대조군에서 제외하였다. 환자군은 가계 자료에서 선정된 발단자와 동일하며 TG 수치가 150mg/dl 이상이고 연령이 20세 이상인 경우로 하였다.

모든 대상들에서 병력, 가족력, 흡연의 유무를 조사하였고 신장과 체중을 측정하여 체질량지수(body mass index, BMI)를 구하였다.

#### 나. 고중성지방혈증 36가계

심혈관계질환 유전체연구에 참여한 환자와 가족들을 중심으로 가계 구성원 중 자녀 한 명이 HTG의 발단자가 되는 가계를 선정하였고 발단자는 환자-대조군 연구에서 이용했던 환자군 39명과 동일하였다. 가족 구성원은 심근경색이나 관동맥질환의 증상이 없는 경우로 발단자를 포함한 가족 구성원의 연령이 20세 이상이고 발단자를 포함한 부모의 혈액이 모두 있고 가족 구성원 모두의 유전형 분석 결과가 있는 부/모/자녀로 이루어진 36가계 154명의 핵가족이었다. 관동맥질환의 위험요소인 TG, 고밀도 지단백 콜레스테롤(high-density lipoprotein cholesterol, HDL), 저밀도 지단백 콜레스테롤(low-density lipoprotein, LDL), 글루코스, 인슐린, 혈압, 콜레스테롤의 수치, 아포지단백 AI(apolipoprotein AI, apo AI), 아포지단백 B(apolipoprotein B, apo B)도 표시하였다. 가계자료에 대한 구성은 표 1에 나타내었다.



표 1. 고중성지방혈증 36 가계의 구성형태

Structure	No. of Families
1 affected sibling, mother and father	15
1 affected sibling and 1 unaffected sibling, mother and father	7
1 affected sibling and 1 unaffected sibling, mother	4
1 affected sibling and 1 unaffected sibling, father	1
1 affected sibling and 2 unaffected sibling, mother	1
1 affected sibling and 2 unaffected sibling, mother and father	4
1 affected sibling and 3 unaffected sibling, mother and father	2
1 affected sibling and 3 unaffected sibling, mother	1
1 affected sibling and 4 unaffected sibling, mother and father	1
Total	36

## 2. 임상 측정

### 가. 혈중 지질농도 측정

10시간 이상의 공복 후 정맥에서 채혈한 혈액에서 혈청 총 콜레스테롤과 중성지방은 자동 분석기(Autoanalyzer Hitachi 7150, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 효소법으로 측정하였고, HDL 콜레스테롤은 침전제를 이용하여 chylomicron, LDL, VLDL을 침전시킨 후 효소법으로 측정하였다. LDL 콜레스테롤은 Friedewald 공식에 의해 계산하였다.

### 나. 혈당 및 인슐린농도 측정

혈당은 포도당 산화효소법으로, 인슐린 농도는 INC(Immuno Nucleo Cooperation, Stillwater, USA)에서 제조한 kit를 사용하여 방사면역법으로 측정하였다. 공복 혈당과 인슐린 농도를 이용하여 HOMA(Homeostasis model assessment)법으로 인슐린 저항성의 정도를 평가하였다.<sup>20)</sup>

### 다. 인체계측

키, 체중, 허리둘레, 수축기/이완기 혈압을 측정하였고 BMI는 몸무게(kg)를 신장의 제곱(m<sup>2</sup>)으로 나누어 계산하였고 허리둘레는 직립자세인 상태로 제대부위에서 측정하였다.

### 3. 분석방법

#### 가. DNA 직접 염기서열 분석

무작위로 추출한 샘플에서 *APOA5* 유전자의 프로모터(~2000bp)와 엑손, 인트론 경계부분의 염기서열을 분석했다. *APOA5* 유전자 염기서열 분석은 엑손과 인트론, 프로모터 부분을 약 400bp의 DNA 조각으로 나누어 polymerase chain reaction(PCR)로 증폭하고 BigDye Terminator Cycle Sequencing reagent를 이용해서 ABI 3100 automated sequencer로 염기서열을 분석하였다.<sup>20</sup>

#### 나. *APOA5* 유전형 분석

혈액은 EDTA 전혈 시험관에 5ml 이상 채혈하고 4시간 이내에 혈청 (serum)과 혈장(plasma)으로 분리하여 -70°C에서 냉동 보관하였다. DNA isolation kit(WIZARD Genomic DNA purification kit; Promega Corp, Madison, WI)를 이용하여 leukocyte에서 DNA를 분리하였다.

변이유전자(minor allele)의 빈도가 5% 이상인 SNP은 single-base extension의 방법으로 유전형을 분석했다. *APOA5* -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, 1259T>C, G182C의 유전형 분석은 SNP stream 25K™ System(Orchid Bioscience, NJ, USA)을 이용하였다. 최종 유전형 분석은 QC Review™ program(Orchid Biosystems, Princeton, NJ)을 이용해서 enzyme-linked immunosorbent assay reader(ELISA)로 분석했다.<sup>20</sup>

*APOA5* G182C의 유전형 분석은 직접 염기서열 분석으로 유전형을 결정하였다.

#### 4. -3A>G 단일염기서열 다형성의 기능 연구

*APOA5* 유전자 3bp upstream의 kozak sequence에 있는 -3A>G 다형성이 *APOA5* 유전자 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 exsite PCR-based site-directed mutagenesis kit(Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 *APOA5*의 cDNA를 만들고 site-directed mutagenesis를 시행하였다. *APOA5* cDNA의 두가지 형태인 -3A와 -3G를 pBluescript II KS (+/-)(Stratagene) 벡터에 클로닝하고 T7 프로모터에서부터 전사가 유도되게 한 후 단일 클로니가 형성된 플라스미드를 wizard plus SV minipreps (Promega, Madison, WI)으로 정제해서 염기서열을 분석하였다. 전사/번역 실험(transcription/translation experiments)은 TNT quick-coupled transcription/translation system(Promega)을 이용했다. -3A>G 다형성의 두 construct인 -3A와 -3G로 luciferase assay를 시행하여 luciferase 발현의 차이를 확인하였다.

#### 5. 통계적인 분석

연구자료는 Statistical Analysis System(SAS) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 연속형 자료는 평균±표준편차, 범주형 자료는 빈도(%)를 제시하였다. 통계적 유의성 검정에서 유의수준은 5%로 하였다.

### 가. 환자-대조군 자료 분석

연관성 분석을 하기 전에 각 SNP의 Hardy-Weinberg equilibrium(HWE)를 검정하였다. 또한 조사한 6개 SNP간에 Lewontin's D'과 상관계수  $r^2$ 를 추정하여 연쇄불평형(linkage disequilibrium, LD) 정도를 알아보았고  $\chi^2$ -검정을 통해 유의성 검정을 하였다.<sup>21</sup>

연관성 분석은 단일 SNP에 대한 분석과 haplotype에 기초한 분석으로 나누어 진행하였다. 단일 SNP에 대한 연관성 분석은 genotype에 기초한 방법과 allele에 기초한 방법을 모두 적용하였고 정확한 p-값을 얻기 위해 10000번을 반복 시행한 permutation test를 시행하였다. Haplotype에 기초한 연관성 분석으로 LRT와 HTR을 적용하였다.<sup>22</sup> LRT 분석에서 환자군, 대조군 그리고 전체자료의 haplotype 빈도는 EM(expectation-Maximization) 알고리즘으로 각각 추정한 후 이들의 우도 차이를 이용하여 환자군과 대조군의 haplotype 빈도 차이가 있는지 검정하였다.

한편 특정 haplotype의 HTG에 대한 유의성 검정은 특정 haplotype과 나머지 haplotype들의 빈도 차이가 있는지  $\chi^2$ -검정을 통해 알아보았고 또한 HTR을 통해 알아보았다. HTR은 추정된 집단의 haplotype 빈도와 각 개인의 유전형으로부터 모든 가능한 haplotype 짝에 대한 빈도를 추정한 후 각 개인이 가질 수 있는 모든 가능한 haplotype들의 빈도들을 독립변수로, HTG 여부를 종속변수로 하여 회귀분석하는 방법이다. 그러나 각 개인이 가질 수 있는 모든 haplotype 빈도들의 합은 항상 1이기 때문에 회귀모형에서 상수항과 수적인 다중공선성(multicollinearity)이 존재하기 때문에 stepwise 방법의 변수선택법을 동시에 적용하여 통계적으로 유의한

haplotype을 찾았다.

반면 6개의 SNP간에 매우 높은 연쇄불평형이 존재한다면 6개의 SNP 모두를 이용한 haplotype 분석은 통계적인 검정력이 약화될 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 6개 SNP의 tag-SNP를 찾은 후 이들 tag-SNP만을 이용하여 앞의 방법과 동일한 haplotype에 기초한 연관성 분석을 재시행하였다. Tag-SNP를 알아보기 위해 *PDE*(proportion of diversity explained) 측도를 사용하였다.

#### 나. 가계 자료의 분석

환자-대조군 연구를 통해 얻어지는 결과를 확인하기 위해 가계 자료를 이용하여 TDT 방법을 사용하였다. 부모/자녀로 구성된 가계 자료에서 사용되는 TDT 방법은 질병이 있는 발단자 자녀에게 부모의 특정 대립인자 또는 haplotype 중에서 전달되는 특정 대립인자 또는 haplotype 빈도와 전달되지 않은 이들의 빈도를 비교하는 방법이다. 분석조건에 따라 부모의 유전형 정보를 모르는 경우 unaffected siblings의 유전형 정보를 이용한 S-TDT(sib TDT)와 SDT(sibling disequilibrium test) 방법, unaffected siblings의 유전형 정보로부터 부모의 유전형 정보를 추정하여 이의 정보를 이용하는 RC-TDT(reconstruction combined TDT) 방법을 이용하였다. 가계 자료의 분석을 위해 single marker와 haplotype의 양적, 질적인 분석 모두가 가능한 family based association test(FBAT, version 1.4) (<http://biosun1.harvard.edu/~fbat/fbat.htm>) 프로그램을 사용하였다.<sup>23-24</sup>

### Ⅲ. 결과

#### 1. 환자-대조군과 가계자료의 임상적 특징

환자-대조군과 가계자료의 임상적 특성은 표 2와 표 3에 표시하였다. 환자-대조군에서 연령, BMI와 TG, 아포지단백 B, 글루코스, 인슐린, 요산은 대조군에 비해 환자군에서 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). LDL과 HDL은 대조군에 비해 환자군에서 유의적으로 낮았지만 HOMA equation은 환자군에서 대조군에 비해 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 콜레스테롤과 아포지단백 AI에서는 유의한 차이가 없었다. 환자군과 대조군을 항목에서 분포상의 차이점을 보였다. 대조군이 환자군보다 약간 젊은 연령이었지만 두 집단간에 성별에 있어서는 차이를 보이지 않았다. 환자군의 위험요소들을 대조군과 비교했을 때 BMI와 글루코스, 인슐린, 아포지단백 B, 전체 콜레스테롤, 요산과 TG의 수치가 환자군에서 더 높게 나타났고 LDL과 HDL, 아포지단백 AI은 대조군에 비해 환자군에서 더 낮은 수치를 보였다.

가계 자료에서는 BMI가 부/모/자녀에서 모두 같은 수치를 보였고 연령의 차이를 제외하고는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

표 2. 환자군과 대조군의 임상적 특성

	Case (N=39)	Control (N=144)	<i>P</i> -value
Age (years)	57.3±10.9	51.3±12.0	<0.01
Gender M/F (% of female)	23/16(41.0%)	93/51(35.4%)	0.64
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.6±2.8	23.7±2.6	<0.01
Total cholesterol (mg/dl)	206.9±44.4	199.6±35.0	0.27
HDL-cholesterol (mg/dl)	39.0±13.0	49.8±12.3	<0.01
LDL-cholesterol (mg/dl)	113.5±37.7	129.0±31.1	0.01
Triglyceride (mg/dl)	286.6±74.0	97.4±28.5	<0.01
Apo AI (mg/dl)	132.9±26.0	138.0±25.5	0.27
Apo B (mg/dl)	98.6±25.6	83.5±20.5	0.00
Glucose (mg/dl)	97.4±17.3	86.9±19.9	0.00
Insulin (mg/dl)	11.5±6.3	7.4±4.1	<0.01
HOMA-IR	2.7±1.5	1.6±0.9	<0.01
Uric acid (mg/dl)	5.8±1.4	5.2±1.2	0.01

BMI, body mass index; HDL-cholesterol, high density lipoprotein cholesterol; LDL-cholesterol, low density lipoprotein cholesterol; Apo AI, apolipoprotein AI; Apo B, apolipoprotein B; HOMA, homeostasis model assessment



표 3. 가계 자료의 임상적 특성

Trait	Father (N=37)	Mother (N=42)	Proband (N=85)
Age (years)	60.3±6.6	57.3±6.5	32.5±6.5
Height (cm)	167.7±4.7	157.4±4.1	168.8±8.4
Weight (kg)	69.3±8.8	61.3±6.8	69.7±13.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.5±2.6	24.7±2.7	24.2±3.6
SBP (mmHg)	130.0±18.4	132.8±19.5	119.5±16.6
DBP (mmHg)	81.4±10.6	81.3±10.9	78.7±11.7
Fasting glucose (mg/dl)	93.3±14.1	95.5±31.7	86.8±22.6
Total cholesterol (mg/dl)	192.1±37.6	207.9±42.9	206.5±37.9
HDL-C (mg/dl)	38.0±9.6	44.1±13.1	42.0±12.1
TG (mg/dl)	238.1±99.2	196.0±98.9	236.3±179.6

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol

## 2. *APOA5* 유전자의 SNP 위치와 DNA 염기서열 분석결과

무작위로 추출한 샘플에서 *APOA5* 유전자 전체의 직접 염기서열을 분석을 통해 12개의 SNP와 1개의 삽입/결손 유전자형(insertion/deletion, I/D)을 확인하였다. 그림 1에 전체 *APOA5* 유전자에서 확인한 SNP의 위치를 표시하였으며 표 4에 각 SNP에 대한 위치와 변이유전자 빈도를 나타내었다.

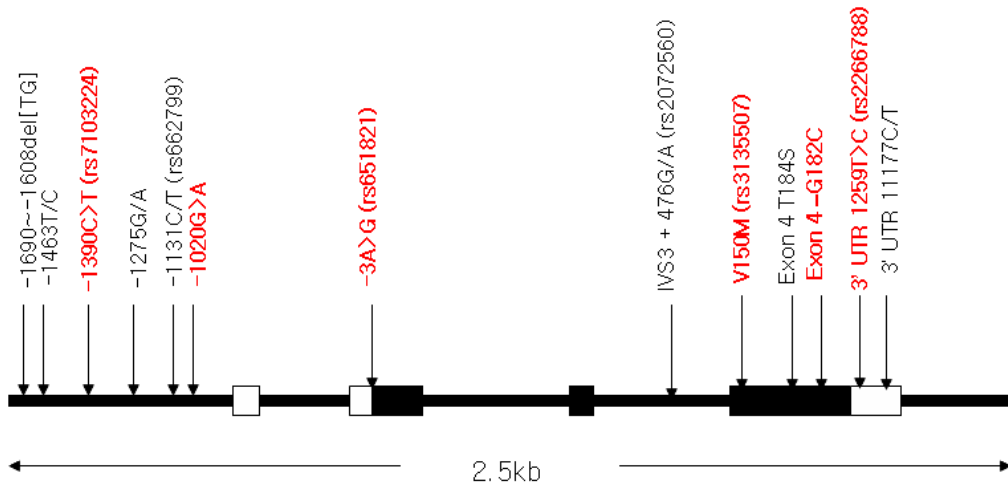


그림 1. *APOA5* 유전자의 구조와 SNP의 위치.

단백질을 코딩하는 엑손은 검정색 사각형으로 나타냈다. 본 연구에서 분석한 SNP는 붉은 글씨로 표시하였다.

표 4. 염기서열 분석을 통해 확인한 *APOA5* 유전자의 SNP 위치와 변이유전자의 빈도

Position	Location	Rs#	Observed heterozygosity (%)	Minor allele frequency (%)
Promoter	-1609~-1608del[TG]		10.4	5.2
	-1463T/C		63.0	33.7
	<b>-1390C&gt;T</b>	7103224	12.8	6.4
	-1275G/A		12.8	6.4
	-1131C/T	662799	41.3	25.0
	<b>-1020G&gt;A</b>		19.6	14.1
	<b>-3A&gt;G</b>	651821	40.9	25.0
Intron3	IVS3+476G/A	2072560	37.0	18.5
Exon4	<b>V150M</b>	3135507	25.0	23.9
	T184S		2.3	1.1
	<b>G182C</b>		13.6	6.8
3'-UTR	1177C/T	2266788	25.6	25.6
	<b>1259T&gt;C</b>		40.4	20.2

Rs#는 reference SNP ID를 나타낸다. 분석에 이용한 SNP는 굵은 글씨로 표시하였다.

### 3. *APOA5* 유전자에서 linkage disequilibrium 분석

두 SNP 간 연쇄불평형 정도는 Lewontin  $D'$  값과 상관계수  $r^2$ 를 추정하여 알아보았다. 표 5는 환자-대조군 자료에서 6개 SNP간  $D'$  값(주대각선 위)과  $r^2$ (주대각선 아래)를 보여주고 있다. 6개 SNP 간 대부분에서 연쇄불평형은 통계적으로 유의하였다.  $D'$  측면에서 연쇄불평형 정도를 살펴보면 대부분의 조합에서 1의 값을 보여 매우 높은 연쇄불평형이 있었으나 -1020G>A는 1259T>C와 0.07, -3A>G와 0.46으로 연쇄불평형 정도가 낮았다. 한편 -3A>G와 1259T>C는  $r^2$ 값이 0.63으로 가장 높은 값을 보인 반면 대부분의 조합에서 연쇄불평형 정도가 낮게 나타났다.

표 5. 환자-대조군 자료에서 linkage disequilibrium

SNPs	D'					
	-1390C>T	-1020G>A	-3A>G	V150M	G182C	1259T>C
-1390C>T	-	0.62	1.00	1.00	1.00	1.00
-1020G>A	0.00	-	0.46	1.00	0.68	0.07
$r^2$ -3A>G	0.05	0.00	-	1.00	1.00	1.00
V150M	0.03	0.01	0.10	-	1.00	1.00
G182C	0.01	0.00	0.22	0.02	-	1.00
1259T>C	0.03	0.00	0.63	0.07	0.02	-

LD를 평가하기 위해 Lewontin의  $D'$ 값(주대각선 위쪽)과 상관계수  $r^2$ (주대각선 아래)를 사용하였다.

#### 4. 환자-대조군 자료의 연관성 분석

##### 가. 유전형과 중성지방 농도와의 연관성

대조군 및 환자군에서 *APOA5* 유전자의 유전형 빈도는 표 6과 같았다. 분석된 *APOA5* 유전자형 분포는 HWE 기본 가정에 만족하였다. 모든 대상자들에서 대립인자의 발생빈도는 -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, G182C, 1259T>C가 각각 0.11, 0.05, 0.28, 0.20, 0.07, 0.19로 나타났다. 표 6에서와 같이 -3A>G 다형성에서 -3A와 -3G의 두 대립인자 빈도는 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 보였고( $p<0.01$ ), -3A>G의 AA, AG, GG 유전형 빈도에서도 환자군과 대조군에서 통계적인 유의성을 보여 중성지방 농도와의 상관성을 나타내었다( $p<0.01$ ).

*APOA5* G182C에서는 유전형 발생빈도가 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 보여 유전형에 따른 중성지방 농도의 차이가 있었다( $p<0.01$ ). 또한 대립인자에 기초한 분석에서도 유의한 차이를 보였다( $p<0.01$ ).

표 6. 환자-대조군 연구를 통해 *APOA5* SNP -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, G182C, 1259T>C에서 나타난 대립인자와 유전형 발생 빈도

SNP	Genotype	Frequency (%)		<i>P</i> -value*	
		Case	Control	Genotype-based	Allele-based
-1390C>T	CC	76.9	78.3	0.90	0.90
	CT	23.0	20.9		
	TT	0.0	0.7		
-1020G>A	AA	0.0	0.7	0.26	0.27
	AG	5.1	9.7		
	GG	94.8	89.5		
-3A>G	AA	30.7	51.7	<0.01	<0.01
	AG	56.4	44.0		
	GG	12.8	3.5		
V150M	AA	0.0	3.5	0.10	0.08
	AG	28.2	37.0		
	GG	71.7	57.3		
G182C	GG	66.6	87.4	<0.01	<0.01
	GT	33.3	11.1		
	TT	0.0	0.7		
1259T>C	CC	7.8	1.4	0.35	0.32
	CT	31.5	37.0		
	TT	60.5	61.5		

\*: *p*-value는 10000번의 permutation test로 확인하였다.



#### 나. Haplotype과 고중성지방혈증과의 연관성

Haplotype에 포함된 SNP들은 순서대로 -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, G182C, 1259T>C였다(표 7). 대조군이나 환자군에서 공통적으로 haplotype 1(CGAGGT), haplotype 2(CGGGGC), haplotype 3(CGGGTT)가 각각 34.9%, 20.1%, 7.81% 내외로 전체 분포의 61% 정도를 차지하였다. 모든 SNP의 major allele로 구성된 haplotype 1과 haplotype 4(CGAAGT)는 환자군보다 대조군에 많은 빈도로 나타난 반면 haplotype 2, haplotype 3, haplotype 5(TGAGGT)는 대조군보다 환자군에서 더 많은 빈도를 보였고 나머지는 두 집단 간에 비슷한 분포를 보였다. 특히 Haplotype 3은 두 집단간의 비교에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.01$ ). 환자군과 대조군 간에 전체적인 haplotype 빈도의 차이가 있는지를 우도비 검정을 시행한 결과  $p$ -값이 0.03으로 환자군과 대조군 간에 haplotype 빈도에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다.

표 7. EM 방법으로 추정된 haplotype의 빈도와 LRT 결과로 나타난 *APOA5* 유전자와 고중성지방혈증의 환자-대조군 연관성 검정

Haplotype <sup>+</sup>	빈도 추정값			p-value
	환자군	대조군	통합군	
CGAGGT(1)	30.8	36.1	34.9	0.48
CGGGGC(2)	24.3	18.8	20.1	0.29
CGGGTT(3)	16.5	5.3	7.8	<0.01
CGAAGT(4)	14.1	22.5	20.6	0.15
TGAGGT(5)	11.5	11.0	11.1	0.95
CAAGGT(6)	2.4	5.6	5.0	0.48
-2x 로그우드	210.4(df=23)	735.2(df=24)	959.4(df=26)	
우도비 통계량	13.8(df=21)			
exact p값	0.03			

\* ( )의 숫자는 haplotype의 일련번호를 표시한다. Haplotype 빈도 1%이상인 경우에만 나타났다.  
df, diversity of freedom

#### 다. SNP의 추가에 따른 PDE값의 변화로 tag-SNP 구성

전진탐색법을 이용해서 SNP가 추가됨에 따라 PDE값이 증가하다가 증가 폭이 떨어지는 지점에서 tag-SNP의 집합을 찾은 결과(표 8) 최적의 tag-SNP 집합은 -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, 1259T>C였다. SNP -1390C>T, -1020G>A, -3A>G와 1259T>C를 tag-SNP 집합에 포함했을 때 PDE가 0.95로 나타났고 -3A>G, V150M과 1259T>C로 이루어진 집합에서는 PDE가 0.88로 감소하여 증가폭이 떨어지는 이 지점에서 tag-SNP를 결정하였다.

표 9A에서와 같이 tag-SNP를 이용한 우도비 검정의 결과는 통계량 값( $p$ 값)이 13.2(0.04)로 6개의 SNP으로 연관성을 분석했을 때보다(표 7)  $p$ 값이 약간 더 크게 나왔지만 tag-SNP만으로 분석했을 때에도 유의한 결과를 보여주고 있어 tag-SNP를 이용한 haplotype은 HTG와 통계적으로 유의하게 연관되어 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 환자군과 대조군, 환자군과 대조군을 합친 통합군에서 가장 많은 빈도를 차지한 haplotype 1T(CGAT)은 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 나타냈고 환자군과 대조군에서 각각 16.6%, 5.9%의 빈도로 나타난 haplotype 3T(CGGT)도 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 나타내었다( $p < 0.01$ ). 표 9B에서는 HTR의 결과를 보여주고 있으며 6개의 SNP로 구성된 haplotype에서는 CGGGTT haplotype이 유의하였고 4개의 tag-SNP로 구성된 haplotype에서는 CGGT haplotype이 통계적으로 유의하였다. 즉, CGGGTT haplotype을 가지고 있는 대상자는 그렇지 않은 대상자에 비해 고중성지방혈증에 걸릴 위험이 17.3배 높았고 또한 4개의 tag-SNP이 CGGT인 대상은 그렇지

않은 대상에 비해 고중성지방혈증에 걸릴 위험이 14.9배로 통계적으로 유의하게 높았다.

표 8. SNP의 조합에 따른 PDE

Number of SNPs	Tag-SNPs						PDE
	-1390C>T	-1020G>A	-3A>G	V150M	G182C	1259T>C	
5	<i>O</i>		<i>O</i>	<i>O</i>	<i>O</i>	<i>O</i>	0.97
4	<i>O</i>	<i>O</i>	<i>O</i>			<i>O</i>	0.95
3			<i>O</i>	<i>O</i>		<i>O</i>	0.88
2	<i>O</i>		<i>O</i>				0.81

PDE, proportion of diversity explained

표 9A. Tag-SNP으로 구성된 haplotype의 빈도와 APOA5 유전자와  
고중성지방혈증의 환자-대조군 연관성 검정

Haplotype <sup>†</sup>	빈도 추정값			p-value
	환자군	대조군	통합군	
CGAT(1T)	45.4	60.0	55.8	<0.01
CGGC(2T)	23.8	17.5	19.6	0.23
CGGT(3T)	16.6	5.9	8.3	<0.01
TGAT(4T)	11.5	10.8	11.2	0.89
CAAT(5T)	2.0	3.8	4.5	0.52
CAGT(6T)	0.5	0.0	0.0	0.31
-2x 로그우드	169.8(df=9)	553.6(df=12)	736.6(df=12)	
우도비 통계량		13.2(df=9)		
exact p값		0.04		

df, diversity of freedom

Tag-SNP의 구성은 -1390C>T, -1020G>A, -3A>G, 1259T>C 순서로 이루어졌다. <sup>†</sup>( )의 숫자는 haplotype의 일련번호를 표시한다. Haplotype 빈도 1%이상인 경우에만 나타났다.

표 9B. *APOA5* 유전자의 SNP와 tag-SNP으로 구성된 haplotype으로  
고중성지방혈증과의 연관성 분석

# of SNPs	Selected haplotype	OR	95% CI
6	CGGGTT(haplotype 3)	17.3	3.1-95.8
4	CGGT(haplotype 3T)	14.9	2.8 - 79.7

OR, odds ratio; CI, confidence interval

## 5. 가계 자료를 이용한 연관성 분석

### 가. TDT 연구를 통해 나타난 고중성지방혈증 관련성

TDT 연구에서는 36가계를 대상으로 하였다. 표 10에서와 같이 SNP -1390C>T와 -3A>G는 단일 SNP로 분석한 STDT와 SDT방법에서 통계적으로 유의한 결과를 보였고 또한 RC-TDT 분석에서도 통계적으로 유의한 결과를 보였다( $p=0.01, 0.03$ ).

### 나. 가계 자료에서 나타난 haplotype의 빈도와 TG와의 연관성 분석

가계자료에서 6개의 SNP과 tag SNP을 이용하여 haplotype을 구성하고 TG와의 연관성을 분석한 결과는 표 11과 표 12에 나타났다. 6개의 SNP로 구성된 haplotype은 CGAGGT(34.1%), CGGGGC(28.1%), CGAAGT(16.2%), CGGGTT(9.9%), TGAGGT(8.2%)로 나타났고 haplotype CGAGGT, CGGGCC, CGAAGT는 전체 분포의 80% 정도를 차지하였고 tag-SNP으로 구성된 haplotype은 6개의 SNP으로 구성된 haplotype과 같은 경향으로 CGAT(50.3%), CGGC(27.7%), CGGT(10.3%)가 전체 88%의 빈도를 차지했다. 가계자료에서 구성된 각각의 haplotype과 TG와의 연관성을 알아보기 위해 분석한 결과 다른 haplotype과는 달리 -1390C>T SNP의 대립인자로 구성된 haplotype TGAGGT가 전체 분포의 8.2% 빈도로 나타났지만 TG와 통계적으로 유의한 결과를 보였다( $p=0.01$ ). 반면 FBAT을 이용해 가계 자료 전체에서 구성된 haplotype과 TG와의 연



관성을 분석한 결과(표 11)에서는 6개의 SNP로 구성된 haplotype은 p값이 충분히 작지 않아 TG와 유의적인 연관성을 나타낸다고 보기 어려웠다( $\chi^2=8.00, 5df, p=0.15$ ). 또한 4개의 tag-SNP만으로 구성된 각각의 haplotype과 TG의 연관성을 분석한 FBAT 결과에서 haplotype TGAT의 경우 TG와 유의적인 연관성을 나타냈지만( $p=0.01$ ) 가계 자료 전체에서 4개의 tag-SNP으로 구성된 haplotype은 6개의 SNP로 분석했을 때보다 상대적으로 약간 더 유의한 결과를 보여주었지만 이 때에도 여전히 p값이 충분히 작지 않아 tag-SNP과 HTG의 위험여부가 통계적으로 유의하게 연관되어 있다고 할 수 없었다( $\chi^2=8.79, 4df, p=0.06$ ).

표 10. 가계 자료를 이용한 *APOA5* 유전자의 TDT 분석

Locus	TDT 통계량 ( <i>p</i> 값)	STDT 통계량 ( <i>p</i> 값)	SDT 통계량 ( <i>p</i> 값)	RCTDT 통계량 ( <i>p</i> 값)
-1390C>T	3.60 (0.11)	6.53 (0.01)	5.33 (0.02)	8.28 (0.00)
-1020G>A	0.00 (1.00)	0.06 (1.00)	0.20 (1.00)	0.00 (1.00)
-3A>G	4.23 (0.06)	0.52 (0.03)	0.75 (0.01)	4.65 (0.03)
V150M	1.63 (0.28)	0.46 (0.55)	1.66 (0.26)	0.14 (0.70)
G182C	2.57 (0.18)	2.57 (0.18)	3.60 (0.10)	2.57 (0.10)
1259T>C	0.61 (0.56)	1.15 (0.34)	2.13 (0.18)	0.88 (0.34)

STDT, sibling transmission disequilibrium test; SDT, sibling disequilibrium test; RC-TDT, reconstruction-combined transmission disequilibrium test

표 11. 가계자료에서 나타난 haplotype의 빈도와 TG와의 연관성을 분석한 FBAT 결과

	Haplotype	Frequency*	P-value
Haplotype 1F	CGAGGT	34.1	1.00
Haplotype 2F	CGGGGC	28.1	0.39
Haplotype 3F	CGAAGT	16.2	0.70
Haplotype 4F	CGGGTT	9.9	0.13
Haplotype 5F	TGAGGT	8.2	0.01
Haplotype 6F	CAAGGT	3.5	-
FBAT		statistics = 8.00 <i>df</i> = 5 <i>p</i> = 0.15	

FBAT, family based association test; *df*, diversity of freedom

\*: haplotype 1% 이상의 빈도를 가진 경우를 표시하였다

표 12. Tag SNP으로 구성된 haplotype의 FBAT 분석 결과

	Haplotype	Frequency	<i>P</i> -value
Haplotype 1T'	CGAT	50.3	0.74
Haplotype 2T'	CGGC	27.7	0.39
Haplotype 3T'	CGGT	10.3	0.07
Haplotype 4T'	TGAT	8.2	0.01
Haplotype 5T'	CAAT	3.5	-
FBAT		Statistics = 8.79 <i>df</i> = 4 <i>p</i> = 0.06	

FBAT, family based association test; *df*, diversity of freedom

## 6. *APOA5* SNP -3A>G의 기능적 연구

프로모터에 있는 SNP -3A>G가 *APOA5* 유전자의 전사와 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 리포터 유전자인 luciferase의 발현여부를 확인한 결과는 **그림 2**에 나타났다. 이는 luciferase assay를 통해 *APOA5*의 리보솜 결합위치(A/G -20~-1)를 중심으로 두 개의 isoform인 -3A와 -3G의 construct가 luciferase 발현상에 차이가 나는 것을 확인하였다( $p < 0.05$ ). -3G construct가 -3A에 비해 luciferase 발현이 낮은 것을 알 수 있었고 이는 통계적으로 유의한 결과로서 Kozak sequence인 -3A>G SNP가 *APOA5* 유전자 프로모터 위치에서 유전자 발현에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

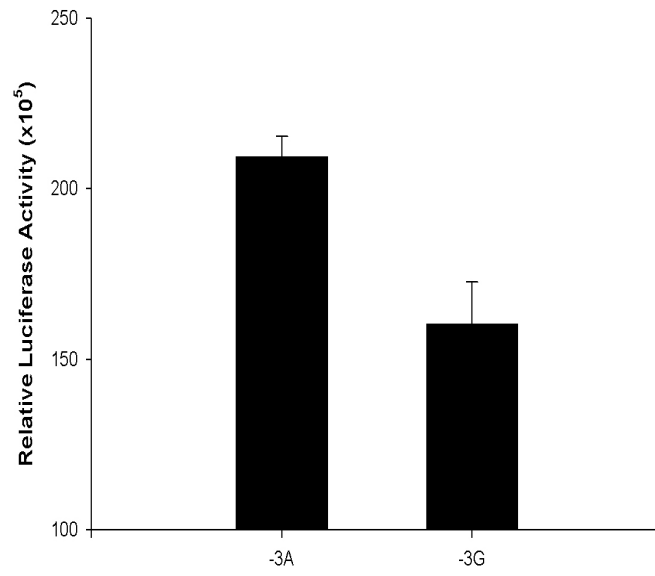


그림 2. Luciferase assay를 이용한 -3A>G 다형성의 기능적 연구

#### IV. 고찰

HTG의 발생과 관련된 후보 유전자들의 연구가 진행되고 있지만 주된 유전적 요인이라고 설명하기에는 연관성이 적었다. 최근 유전자의 전체 염기서열 분석을 통해 질병과의 연관성 연구가 진행되면서 북아이리쉬 인종을 대상으로 한 연구에서 *APOC3*와 *APOA5* 두 유전자와 HTG의 연관성이 보고된 바 있었다.<sup>2</sup>

HTG와 함께 관동맥질환 발생의 주된 위험요인으로 알려지고 있는 중성지방 농도는 유전적인 요인과 환경적인 요인 모두의 영향을 받는 것으로 알려져 있다.<sup>25</sup> 중성지방의 역할에 대해 여전히 의견이 엇갈리지만 질병 발생학적 면에서 증가된 LDL 수치, HDL의 감소와 함께 중성지방의 증가는 위험요인으로 작용하고 있다. 중성지방은 담배, 비만, 알콜, 운동 등과 같은 다양한 환경적인 요소에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 또한 쌍둥이 연구를 통해 유전적인 요인이 중성지방 수치에 영향을 주는 것으로 보고되었다.<sup>18</sup> 가족성 고지질혈증 환자를 대상으로 한 연구에서 apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster에서 밝혀진 SNP와 haplotype이 중성지방 농도와 LDL particle 크기를 결정하는데 관여한다는 것이 알려지면서 가족성 고지질혈증과 관련된 *APOA5* 유전자 다형성이 연구되고 있다.<sup>25-27</sup>

타이완-중국인을 대상으로 한 연구에서 Hsu 등이 *APOA5* 유전자의 새로운 SNP로 보고한 553G>T는 시스테인에서 글라이신으로 아미노산의 변화를 초래하는 SNP로써 HTG와 연관성이 있었다.<sup>18</sup> 코딩 부분의 SNP인 56C>G(S19W)은 haplotype을 구성하는 SNP로서 아프리카계-미국인, 히스

파나인, 유럽인들을 대상으로 한 연구에서 높은 TG 수치와 연관성이 있었다.<sup>17</sup> *APOA5* SNP 중 프로모터 부분에 있는 -1131T>C는 TG 조절에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>17-18</sup> Austin 등은 -1131C/-3G를 포함하는 haplotype이 일본계 미국인에게서 흔하게 나타나고 -3A>G SNP가 아시아인에서 TG 수치와 LDL의 particle 크기를 결정하는데 관여하는 것 뿐 아니라 TG와 연관성이 있다고 보고하였다.<sup>14</sup>

본 연구에서 분석한 한국인 환자-대조군 자료에서는 중성지방과 유의적인 연관성을 보이는 유전형이 -3A>G와 G182C로 나타났다. 반면 가계 자료를 이용한 TDT 분석에서는 -1390T>C와 -3A>G 유전형이 중성지방과 유의적인 연관성을 보였다. 이 결과를 통해 공통적으로 나타난 -3A>G 유전형이 한국인에서 HTG의 위험여부와 관련된 다형성임을 확인하였고 이는 -3A>G 다형성이 서양인에서 보고된 것보다 높은 빈도로 나타났고 일본인과 중국인에서도 비슷한 결과를 보이는 SNP라는 결과와 일치했다. 또한 일본계 미국인 뿐 아니라 아시아권내에서 TG 농도와 연관성이 있고 LDL particle의 크기를 결정하는데 관여하는 주요 SNP라는 연구결과와 일치하는 것으로 해석할 수 있었다.<sup>14</sup> 반면 분석에는 포함되지 않았지만 프로모터 부분에서 발견된 -1131T>C 다형성은 한국인에서도 나타나는 SNP로서 서양인에서와 같이 중성지방 조절에 관여하는 SNP인 것으로 확인되었다.<sup>20</sup> 또한 -1131T>C와 강한 LD를 보이는 -3A>G 다형성은 전사시작 코돈이 있는 Kozak sequence에 위치해 있어 본 연구에서도 기능 연구를 통해 *APOA5* 유전자의 전사에 영향을 주는 것으로 나타났다.<sup>18</sup> 서양인에 비해 중국인에서 나타나는 또다른 다형성인 553G>T는 타이완-중국인을 대상으로 한 연구에서 HTG와 유의적인 연관성을 보이는 유전형으로 나타났



지만 한국인에선 관찰되지 않았다. 반면 한국인에서는 나타난 G182C 다형성은 타이완인들을 대상으로 한 당뇨병 환자-대조군 연구에서 TG와의 연관성을 보고한 결과가 있었지만 기능에 대해선 알려진 게 없었다.<sup>28</sup>

환자-대조군 연구에서 나타난 haplotype CGGGTT가 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 나타냈고 다른 haplotype에 비해 HTG의 위험여부와 관계있는 haplotype으로 나타났다. 또한 haplotype CGGGTT는 -3A>G와 G182C 다형성의 대립유전자로 구성된 haplotype으로 -3A>G와 G182C 다형성이 중성지방 농도를 결정할 뿐 아니라 haplotype 구성에도 관여하는 한국인 특이 SNP인 것으로 볼 수 있었다. 이와 마찬가지로 tag-SNP으로 구성된 haplotype CGGT가 HTG의 위험여부와 관련있을 뿐 아니라 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 나타낸다는 것을 확인했다. 이로써 6개의 SNP를 모두 이용한 분석의 결과와 tag-SNP만으로 분석한 결과가 서로 일치한다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 특정 유전자에서 알려진 모든 SNP로 질병과의 연관성 연구를 진행하는 것보다 여분의 SNP를 제외한 tag-SNP만으로도 다양한 haplotype을 구성하고 질병과의 연관성을 분석하는 방법이 더 효율적임을 나타냈다. 또한 본 연구에서 이용한 APOA5 유전자는 그 크기가 2.5kb로 그리 크지 않은 유전자이기 때문에 6개의 SNP를 이용하여 연관성 연구를 진행하는데 어려움이 있진 않았지만 더 많은 SNP를 이용한 연관성 분석에서는 tag-SNP을 이용한 분석만으로도 통계적으로 유의한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

가계 자료 분석을 통해서는 6개의 SNP로 구성된 haplotype TGAGGT가 HTG의 위험여부와 연관되어 있는 haplotype으로 나타났다. 이는 -1390T>C 다형성의 변이유전자인 -1390T로 구성된 것으로써 TDT 연구

에서 -1390T>C 다형성은 TG와 유의적인 연관성을 보여 -1390T>C 다형성 역시 본 연구에서 사용한 자료에서 TG와 연관성이 있는 SNP인 것으로 확인되었다. 이로써 *APOA5* 유전자의 -3A>G와 G182C 다형성과 더불어 본 연구에서 확인된 -1390T>C 다형성도 한국인 특이적인 SNP인 것으로 해석할 수 있었다. 또한 가계 연구에서는 tag-SNP으로 구성된 haplotype TGAT가 HTG 위험여부와 연관성이 있었다. 이것으로 환자-대조군 연구와는 달리 가계 자료에서는 다른 조합의 haplotype이 HTG 위험여부와 연관되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 가계 자료와 환자-대조군 자료에서 동일한 발단자를 이용했지만 발단자를 제외한 다른 가계 구성원들의 haplotype 조합이 달라질 수 있기 때문에 환자-대조군 자료의 결과와 일치하지 않을 수도 있다고 여겨진다. 하지만 6개의 SNP로 구성된 haplotype과 tag-SNP만으로 구성된 haplotype의 조합이 일치하는 것으로 보아 tag-SNP만을 이용해서 HTG 위험여부를 분석하는 것이 더 효율적인 방법이라 생각된다. 가계 자료를 이용한 FBAT 분석에서 각각의 haplotype은 HTG 위험여부와 관련있는 결과가 있었지만 모든 haplotype의 조합을 이용해 HTG 위험여부의 연관성을 분석한 결과에서는 통계적으로 유의한 차이가 적어 위험인자로 작용하기는 미흡한 것으로 보인다. 환자-대조군 연구와 가계 자료를 이용한 연구결과에서 차이를 보이는 이유는 가계 자료의 연구대상자 수가 상대적으로 적어 연관성을 밝히기에 충분하지 않았다고 생각된다. 그렇기 때문에 가계 자료에서 HTG를 정의하는 있어 TG의 기준을 낮춤으로서 이들 연관성의 강도가 약화되었을 가능성도 있다. 향후 충분한 연구 대상자를 확보하고 *APOA5* 유전자의 한국인 특이 SNP를 이용해 연구할 필요성이 있다고 생각된다. 또한 다른 인종과 비교했을 때 한

국민과 서양인에서 공통적으로 나타나는 유전형이 있었지만 유전형간의 연령, 흡연, 음주 등과 같은 기본적인 임상적인 특징과 환경적인 요인이 다르기 때문에 한국인 특이 유전형으로 인해 다양한 환경적, 유전적인 요인이 HTG의 위험여부에 영향을 주는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서의 여러 제한점을 고려할 때 보다 많은 대상의 추가적인 연구와 우리나라와 인종적인 배경이 비슷한 다른 아시아인들과의 결과를 비교하는 것이 필요하다고 생각한다.

또한 환자-대조군 연구와 가계 연구에서 중성지방 농도 조절에 관여하는 것으로 밝혀진 -3A>G 다형성의 기능적 연구가 본 연구에서 확인한 다른 SNP에도 적용된다면 SNP의 기능 뿐 아니라 *APOA5* 유전자의 전사와 발현에 관여하는 중요한 SNP도 확인할 수 있을 것으로 보인다. 향후 충분한 연구대상자를 확보함으로써 tag-SNP으로 구성된 haplotype 분석으로 HTG의 위험여부와 관련된 haplotype을 알아냄으로써 질병 진단에 이용할 수 있을 것이라 생각된다.

## V. 결론

*APOA5* 유전자 전체의 직접 염기서열 분석으로 한국인 *APOA5* 유전자의 SNP와 haplotype을 확인하고 HTG 환자-대조군 연구와 가계 자료를 이용한 연관성 분석을 통해 *APOA5* 유전자와 TG와의 연관성을 알아보았다. 환자-대조군 연구에서는 -3A>G, G182C의 다형성과 TG와의 연관성이 나타났고 haplotype과 TG의 연관성을 분석한 LRT 결과에서 유의적으로 연관되어 있음을 알 수 있었다. 또한 tag-SNP으로 분석한 HTR 결과에서도 특정 haplotype을 가질 때 HTG 위험여부가 다른 haplotype을 가질 때보다 높게 나타나는 것을 확인하였다.

환자-대조군 연구의 보완과 검토를 위해 36 가계 자료를 이용한 TDT 연구를 시행하였다. 환자-대조군 연구와 동일한 6개의 SNP로 분석한 결과 -1390C>T와 -3A>G의 다형성이 TG와 유의적인 연관성을 보이는 SNP인 것으로 확인하였다. Tag-SNP을 이용해 TDT, FBAT 통계량을 분석하고 haplotype과 HTG의 연쇄 및 연관성을 검정한 결과 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못했다.

## 참고문헌

1. Jakel H, Nowak M, Helleboid-Chapman A, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride-rich lipoproteins ?. *Ann Med* 2006;38:2-10.
2. Wright WT, Young IS, Nicholls DP, Patterson C, Lyttle K, Graham CA. SNPs at the *APOA5* gene account for the strong association with hypertriglyceridaemia at the *APOA5/A4/C3/A1* locus on chromosome 11q23 in the Northern Irish population. *Atherosclerosis* 2006;185:353-360.
3. Olofsson S. ApoA-V ; The regulation of a regulator of plasma triglycerides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1097-1099.
4. Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TWA, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2000;157:1-11.
5. Busch CP, Hegele RA. Variation of candidate genes in triglyceride metabolism. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:309-315.
6. Henneman P, Schaap FG, Havekes LM, Rensen PC, Frants RR, van Tol A, Hattori H, Smelt AH, van Dijk KW. Plasma apoAV levels are markedly elevated in severe hypertriglyceridemia and positively correlated with the *APOA5* S19W polymorphism. *Atherosclerosis* In press 2006.
7. Charlton-Menys V, Durrington PN. Apolipoprotein A5 and

- hypertriglyceridemia. *Clin Chem* 2005;51:295-297.
8. Tang Y, Sun P, Guo D, Ferro A, Ji Y, Chen Q, Fan L. A genetic variant c.553G>T in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and altered triglyceride levels in a Chinese population. *Atherosclerosis* 2006;185:433-437.
  9. Dallongeville J, Cottel D, Montaye M, Codron V, Amouyel P, Helbecque N. Impact of *APOA5/A4/C3* genetic polymorphisms on lipid variables and cardiovascular disease risk in french men. *Int J Cardiol* 2006;106:152-156.
  10. Pennacchio LA, Rubin EM. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:529-534.
  11. Hubacek JA. Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:897-902.
  12. van Dijk KW, Renson PC, Voshol PJ, Havekes LM. The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV : synergistic actors in triglyceride metabolism ?. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:239-246.
  13. Szalai C, Keszei M, Duba J, Prohaszka Z, Kozma GT, Csaszar A, Balogh S, Almassy Z, Fust G, Czinner A. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;173:109-114.

14. Austin MA, Talmud PJ, Farin FM, Nickerson DA, Edwards KL, Leonetti D, McNeely MJ, Viernes H-M, Humphries SE, Fujimoto WY. Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1688:1-9.
15. Klos KLE, Hamon S, Clark AG, Boerwinkle E, Liu K, Sing CF. *APOA5* polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African Americans and whites of the CARDIA study. *J Lipid Res* 2005;46:564-570.
16. Bi N, Yan SK, Li GP, Yin ZN, Chen BS. A single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and alters triglyceride metabolism in Chinese. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004;83:280-286.
17. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Human Molecular Genetics* 2002;11:3031-3038.
18. Hsu LA, Ko YL, Chang CJ, Hu CF, Wu S, Teng MS, Wang CL, Ho WJ, Ko YS, Hsu TS, Lee TS. Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 2006;185:143-149.
19. 김진흠, 남정모, 강대룡, 서일. 일배체형에 기초한 고혈압과 ACE 유전

- 자의 연관성 분석. 응용통계연구 2005;18:297-310.
20. Jang Y, Kim JY, Kim OY, Lee JE, Cho H, Ordovas JM, Lee JH. The -1131T→C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriacylglyceridemia; elevated small, dense concentrations; and oxidative stress nonobese Korean men. *Am J Clin Nutr* 2004;80:832-840.
  21. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995;29:311-322.
  22. Zhao JH, Curtis D, Sham PC. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered* 2000;50:133-9.21.
  23. Allen A, Belton C, Patterson C, Horan P, McGlinchey P, Spence M, Evans A, Fogarty D, McKeowon P. Family-based association studies of lipid gene polymorphisms in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005;96:52-55.
  24. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Gen* 2001;9:301-306.
  25. Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, Pennacchio LA, Humphries SE. Relative contribution of variation within the *APOC3/A4/A5* gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 2002;11:3039-3046.
  26. Liu H, Zhang S, Lin J, Li H, Huang A, Xiao C, Li X, Su Z, Wang C, Nebert DW, Zhou B, Zheng K, Shi J, Li G, Huang D. Association



- between DNA variant sites in the apolipoprotein A5 gene and coronary heart disease in Chinese. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005;54:568-572.
27. Mar R, Pajukanta P, Allayee H, Groenendijk M, Dallinga-Thie G, Krass RM, Sinsheimer JS, Cantor RM, de Bruin TWA, Lysis AJ. Association of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ Res* 2004;94:993-999.
28. Jiang YD, Yen CJ, Chou WL, Kuo SS, Lee KC, Chiu KC, Chuang LM. Interaction of the G182C polymorphism in the *APOA5* gene and fasting plasma glucose on plasma triglycerides in type 2 diabetic subjects. *Diabet Med* 2005;22:1690-1695.

Genetic effects of Apolipoprotein A5 on plasma lipoprotein level by  
case-control study and family-based association study

Choi Jung Ran

*Department of Medical Science*  
*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by *Professor Yangsoo Jang*)

Recent studies using human and mice reported that apolipoprotein A-V (*APOA5*) gene plays an important role in controlling triglyceride (TG) concentrations. The aim of this study was to analyze these associations in Korean patients and also to test for association of *APOA5* with susceptibility to hypertriglyceridemia (HTG). We examined a case-control samples consisting of 39 patients with HTG and 144 healthy control subjects and 36 nuclear families. Six single nucleotide polymorphisms (-1390C>T, -1020G>A, -3A>G, V150M, G182C and 1259T>C) were genotyped in the *APOA5* gene. A haplotype CGGGTT was significantly predominant in patients with HTG ( $p < 0.01$ ). Using log-likelihood ratio test (LRT), we observed a highly significant association between the haplotypes and HTG ( $p = 0.03$ ). Haplotype-trend logistic regression (HTR) analysis revealed a

significant association between the CGGGTT and HTG ( $OR = 17.3$  95%  $CI=3.1-95.8$ ). This significant association was critically dependent on one tag-SNP, CGGT ( $OD = 14.9$ , 95%  $CI = 2.8-79.7$ ). In this family-based association study, transmission disequilibrium test (TDT) revealed positive association between -1390T>C, -3A>G and TG ( $p < 0.01$  and  $0.03$ , respectively). These findings strongly support association of the *APOA5* gene with susceptibility to HTG in Korean patients. Further studies are needed to confirm these findings in other populations and to identify functional variants in *APOA5* that may be implicated in pathogenesis.

---

**Keywords** : apolipoprotein A-V, hypertriglyceridemia, triglyceride, family-based association study, case-control study, tag-SNP