

한국인 인슐린 비의존형 당뇨병 및 이차성 당뇨병 환자에서 글루코키나제 유전자 변이

연세대학교 의과대학 내과학교실

남재현 · 이현철 · 김연의 · 권석호 · 윤용석 · 박석원 · 원영준
차봉수 · 송영득 · 이은직 · 임승길 · 김경래 · 허갑범

서 론

평균 유병율이 인구의 5% 이상을 점하는 인슐린 비의존형 당뇨병은 인슐린의 상대적인 결핍과 인슐린 저항성에 의하여 발생하는 것으로 비만이나 신체활동의 감소 혹은 스트레스와 같은 환경적 요인과 함께 유전적 요소^{2,3)}가 같이 관여하여 발생하지만 유전양식이나 유전 인자에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다^{4,5)}.

최근 급속히 발달한 분자 생물학 기술의 응용으로 당뇨병 분야에 있어서도 포도당 대사 및 인슐린 분비에 관계되는 인슐린 유전자⁶⁾, 인슐린 수용체 유전자⁷⁾, 당수송체^{8,9)}, 미토콘드리아 유전자¹⁰⁾, 당뇨병과 동반되는 지질대사 이상에 관련이 되는 아포지단백 유전자¹¹⁾ 등에 대한 연구가 진행되고 있으나 아직까지는 당뇨병의 원인 중 일부만을 설명할 수 있다.

글루코키나제 유전자도 인슐린 비의존형 당뇨병을 일으키는 유전자의 하나로 생각되고 있는데 이는 인슐린 저항성과 인슐린 분비 장애를 일으킬 수 있기 때문이다. 최근 다형성 유전자 표지자에 의한 가계 연구를 통해 글루코키나제를 coding하는 유전자의 돌연변이가 인슐린 비의존형 당뇨병의 아형인 MODY (maturity onset diabetes of the youth)를 유발하는 원인이 됨이 밝혀졌다^{12,13)}. MODY는 25세 이전에 발병하는 제 2형 인슐린 비의존형 당뇨병의 한 유형으로 상염색체 우성으로 유전하고 초기에 병이 발병하지만 증상이 경하기 때문에 철저한 임상 검사와 가족력을 조사하지 않으면 정확한 진단이 쉽지 않다. 따라서 글루코키나제 유전자 돌연변이를 갖고있는 상당수의 환자는 경한 당뇨병이나

임신성 당뇨병, 신이식후 당뇨병의 형태로 발현될 수도 있을 것으로 추측할 수 있다.

본 연구는 인슐린 비의존형 당뇨병, 임신성 당뇨병 및 신이식후 당뇨병 환자에서 genomic DNA를 얻고 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 및 단일쇄 변이분석(single strand conformation polymorphism, SSCP) 방법으로 일차 검사하고, SSCP상이 있는 엑손은 돌연변이 부위의 염기서열을 확인하여 한국인에게 있어 글루코키나제 돌연변이와의 연관성과 그 유전양상에 대하여 연구하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1991년 3월부터 1995년 2월까지 본원에 내원하여 병력과 검사소견에서 WHO 기준에 의해 인슐린 비의존형 당뇨병으로 진단 받은 39명의 환자, 신이식후 발생한 당뇨병 환자 58명 및 임신성 당뇨병환자 2명을 환자군으로 하였으며 건강한 자원자 45명을 대조군으로 하였다.

2. 방법

가. 환자의 혈액으로부터 Genomic DNA의 추출

Sambrook 등¹⁴⁾의 방법에 근거로 하여, 약간의 변형을 가한 방법을 사용하였다. 환자의 전혈 10ml를 채혈하여 37°C NH₄Cl:Tris 용액 (140mM NH₄Cl, 17mM Tris, pH 7.6)을 섞어 적혈구를 용혈시킨 후 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 침전으로 가라앉은 백혈구 세포 압착 결정 (leukocytic nuclear pellet)에 식염수 10ml를 첨가하여 침전을 용해시켰다. 다시 10분간

접 수 : 1997년 9월 12일
통 과 : 1997년 11월 25일

Table 1. PCR 및 SSCP-PCR 에 사용되는 Primer의 sequence

Exon	upstream primer	Downstream primer	Size, bp
1a	5'-TCCACTTCAGAAGCCTACTG	5'-TCAGATTCTGAGGCTCAAAC	195
1b	5'-AGCAGGCAGGAGCATCTCTG	5'-GCTGCTCTCCCAGTGCAAAG	149
1c	5'-CCAGACTCTCCTCTGAACTC	5'-GAAGAAGAGGTTCCATCTG	145
2	5'-TGCAGATGCCTGGTGACAGC	5'-CACAGCTGCTTCTGGATGAG	290
3	5'-TAATATCCGGCTACGTACC	5'-CTGAGATCCTGCATGCCTTG	295
4	5'-TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG	5'-TGAAGGCAGAGTTCTCTGG	272
5	5'-GCAGCCACGAGGCCTATCTC	5'-GAGAAAGGCAGGCAGTGCTG	195
6	5'-CCAGCACTGCAGCTTCTGTG	5'-GAGCCTCGGCAGTCTGGAAG	176
7	5'-AGTGCAGCTCTCGTGACAG	5'-CATCTGCCGCTGCACCAGAG	285
8	5'-TGCCTGCTGATGTAATGGTC	5'-TGAGACCAAGTCTGCAGTGC	263
9	5'-ACTGTCCGAGCGACACTCAG	5'-CTTGGAGCTTGGGAACCGCA	367
10	5'-GTCGACTGCGTGAGGGCGC	5'-TGTGGCATCCTCCCTGCGCT	263

원심침전하고 상등액을 조심스럽게 제거한 후 다시 10ml의 식염수를 가하여 침전을 씻어 내었다. 튜브 바닥에 남은 백혈구 압착 결정에 2ml의 high TE buffer (100mM Tris, 40mM EDTA, pH 8.0)를 넣어 잘 섞은 후 2ml의 백혈구 용해 용액 (100mM Tris, 40mM EDTA, 0.2% SDS, pH 8.0)을 첨가하여 DNA가 세포 밖으로 빠져나오도록 한 후 Proteinase K(20mg/ml)를 사용하여 단백질을 분해시켰다. 반응이 끝난 용액에 페놀, 3M sodium acetate(pH 5.2)와 95% 에탄올을 사용하여 DNA를 분리한 후 1ml의 low TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, 50 µg/ml RNase)를 넣어 DNA를 추출한 후 분광 광도계로 260nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 정량하였다.

나. 시발체의 합성

글루코키나제 유전자를 구성하는 12개 엑손(exon) 각각에 대하여 20개의 뉴클레오티드로 이루어진 12쌍의 DNA 시발체를 DNA 합성기(392 DNA/RNA Synthesizer, Applied/biosystem, CA, USA)를 이용하여 합성하여 증합효소 연쇄반응과 단일쇄 변이분석의 시발체로 사용하였다 (Table 1).

다. 증합효소 연쇄반응과 단일쇄 변이 분석

반응 완충액 1ul, 2.0mM dNTP 1ul, 시발체 0.8pmole, Tag DNA polymerase 0.25U, [α -³²P]dCTP(3000Ci/mmol) 1 µCi 그리고 genomic DNA 100ng을 혼합하고

증류수를 반응량이 10ul가 되게 넣은 후 20ul의 오일을 첨가하여 간단히 원심 분리한 후 증합효소 연쇄반응 증폭을 수행하였다. 반응이 완료된 혼합액에서 1ul을 새 튜브에 분주하고 9ul의 formamide dye(98% formamide, 20mM EDTA pH 8.0, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)를 넣어 혼합한 후 95°C에서 3분간 열을 가하여 증폭 DNA를 단일나선으로 변성시키고 즉시 열을 위에서 냉각시킨 후, 10%(vol/vol) glycerol을 포함한 6% non-denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동을 하였다. 6-20 W의 전류로 5-15시간 동안 균일한 적정 온도에서 전기영동을 실시하였고 전기영동이 끝난 gel 판에서 유리판을 분리하고 Whatman 3MM 용지로 gel을 옮긴 후 랩으로 평평하게 덮는다. Gel 건조기 (80°C)에서 30분간 건조시키고 랩을 벗겨내어 카세트에 고정시킨 후, 암실에서 X-ray 필름을 장착하여 -70°C에서 6-12시간 정도 노출시킨 후 필름을 현상하여 분석결과를 판독하였다.

라. 돌연변이 부위의 염기서열 결정

(1) PCR에 의한 글루코키나제 유전자의 증폭

SSCP 분석 결과 돌연변이가 나타난 DNA를 선정하여 PCR을 수행하였다. Microfuge tube 안에 77.5 µl의 증류수, 2ul의 genomic DNA(1 µg), 각각 0.2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 µl의 반응 완충액, 그리고 0.1 µM 시발체를 혼합한 후 혼합액 상층부에 100 µl의 오일을 첨가하였다. 95°C에서 5분간 열 처리

를 하여 DNA추출시 잔존하는 protease를 비 활성화시키고 한편으로는 DNA가 충분히 변성되도록 한 후, 72°C로 온도를 변환시켰다. 각 튜브에 0.5 μ l의 Taq DNA polymerase(2.5U)를 오일 층을 통과해 반응 혼합액에 넣어 혼합한 후, 다음의 PCR 증폭을 30회 수행하였다(denaturation: 94°C 0.5-1분, annealing: 55°C 0.5-1분, extension: 72°C 1분). 적정 PCR 증폭이 완료된 반응 혼합액은 마지막 과정(72°C)을 5분간 연장하여 증폭된 DNA 절편들이 충분히 이중나선을 형성하도록 유도한 후 튜브 상층부의 오일을 조심스럽게 제거하고 동량의 chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 넣어 잘 혼합한 후, 5분간 원심 분리하였다. 위의 상등액을 새 튜브에 옮기고 0.1 배의 3M Sodium acetate(pH 5.2)와 2.5배의 95% 에탄올을 넣어 혼합하여 15분간 -70°C 에서 냉각시켰다. 15분간 4°C에서 원심 분리한 후 상등액을 제거한 후 침전물은 70% 에탄올을 넣어 세척한 후, 5분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 바닥에 남은 최종 PCR 증폭 DNA는 진공건조 하여 20 μ l의 TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 또는 증류수에 녹인 후, 그 중 1-2 μ l 를 전기영동하여 결과를 판정하였다.

(2) PCR 증폭 DNA에서 특정 DNA 절편의 회수

각 역손에 따라서 시발체에 의해 증폭되는 DNA의 크기는 100-400 bp 사이이기 때문에 3-2%(wt/vol)의 LMT(low melting temperaure) agarose gel에서 PCR 산물을 전기영동에 의해 분리하였다. UV-lamp 아래에서 원하는 부위의 DNA band를 절단하여 1.5ml 튜브에 넣고 3 분간 원심 분리한 후 부피를 측정하였다. 5 배의 Buffer (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)를 넣고 80°C 에서 10분간 가열하여 agarose를 완전히 녹인 후 동량의 폐놀 을 넣고 흔들어 섞은 후, 5분간 원심 분리하였다. 상등액을 새 튜브에 옮기고 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 넣고 섞은 후, 5 분간 원심 분리한 후 상등액을 새 튜브에 옮기고 동량의 chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 넣고 섞은 후, 5분간 원심 분리하였다. 다시 상등액을 새 튜브로 옮기고 0.1 배의 3M Sodium acetate(pH 5.2)와 2.5 배 95% 에탄올을 넣어 혼합한 후, -70°C 에서 15 분간 냉각하였다. 4°C에서 15분간 원심 분리 후, 상등액은 제거한 후 DNA 침전물에 70% 에탄올을 넣어 세

척하고 5 분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 DNA 침전물을 진공건조 하여 10 μ l의 TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 또는 증류수에 녹인 후, 그 중 1-2 μ l을 전기영동하여 농도를 판정하였다.

(3) Sequencing primer의 방사선 동위원소 표지

염기서열 분석을 위해 각 역손마다 적절한 염기서열의 nested primer를 설계하고 합성하였다. Sequencing primer의 방사선 동위원소 표지를 위하여 0.5ml tube에 1 μ l의 nested primer(10pmol/ μ l), 3 μ l의 [γ -³²P]dATP (3000Ci/nmole), 1 μ l의 반응 완충액(50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl₂, 50mM DTT, 1mM spermidine), 0.7 μ l의 T₄ polynucleotide kinase(8U/ μ l) 그리고 4.3 μ l의 증류수를 넣었다. 37°C에서 30분간 primer 5' 말단에 표지자 부착반응을 유도한 후, 2분간 90°C에서 열처리하여 효소반응을 중단시킨 후 간단히 원심 분리한 다음 표지자 부착 primer는 정제과정 없이 DNA sequencing 반응에 사용하였으며 -20°C에 보관하였다.

(4) 염기서열 결정을 위한 Direct Sequencing

염기서열 반응당 4개의 0.5ml 튜브를 준비하고 'G', 'A', 'T', 'C'를 표기한 후 각 튜브에 해당되는 80 μ M dNTP와 8 μ M d/ddNTP 혼합액을 2 μ l씩 넣어 얼음 위에 놓아두었다. 새 튜브에 한 반응당 2 μ l의 PCR 증폭 DNA (앞에서 설명한 정제된 DNA), 5 μ l의 반응 완충액(250mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂), 1.5 μ l의 표지자 부착 primer 그리고 7.5 μ l의 증류수의 혼합물을 준비하였고 여기에 5U의 Taq DNA polymerase를 넣어 잘 혼합하고 간단히 원심 분리 후 위의 d/ddNTP mix가 들어있는 4 개의 tube에 각각 4 μ l씩 첨가하였다. 한 방울의 오일을 위의 4개의 튜브에 첨가하고 간단히 원심 분리하였고 미리 94°C로 고정시킨 Thermocycler에 4개의 튜브를 장착하고 94°C 에서 3분간 열처리 후, 적정조건(denaturation : 94에서 0.5 분, annealing : 58°C에서 0.3분, extension : 72°C에서 1분)에서 PCR 증폭을 수행하였다. PCR이 끝난 각 튜브의 안쪽 벽면에 3 μ l의 stop solution(10mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)을 첨가하고 간단히 원심침전하여 sequencing 반응을 종료시켰다. 각 튜브를 3 분간 90°C에서 열 처리하여 반응 혼합물을 변성하고, 즉시

얼음 위에서 냉각시킨 후 위의 각 반응혼합물은 미리 준비된 6% polyacrylamide gel(0.3mm두께)의 각 well에 1.5-2.5 μ l씩 분주하였다. 적정 시간의 전기영동이 끝난 후, gel판에서 한쪽 유리판을 분리하고 Whatman 3MM 용지로 gel을 옮긴 후, 랩으로 균일하게 덮은 후 Gel건조기(80 $^{\circ}$ C)에서 30분간 건조시키고 랩은 벗겨내어 카세트에 고정시킨 후, 암실에서 X-ray 필름을 장착하여 12시간 정도 노출시키고 암실에서 X-ray 필름을 현상하여 분석결과를 판독하였다.

결 과

1. SSCP 결과

인슐린 비의존형 당뇨병환자 39명, 신이식후 발생한 당뇨병환자 58명, 임신성 당뇨병환자 2명 및 정상 대조군 45명 등 144명에 대해 글루코키나제의 12개 엑손을 PCR을 이용하여 증폭하고 SSCP를 시행하였다. SSCP에 변이를 보인 환자는 모두 신이식후 발생한 당뇨병환자에서 발견되었는데 엑손 5에 1명 (Fig. 1), 엑손 7에 1명 (Fig. 2)이었으며 정상대조군에서는 엑손 9에 1명 (Fig. 3) 있었다 (Table 2).

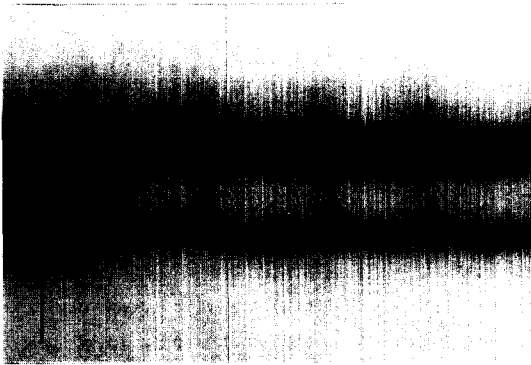


Fig. 1. SSCP analysis of the exon 5. The abnormal band is indicated with an arrow.

2. 염기서열 분석 결과

엑손 5에 나타난 SSCP 변이는 유전자 염기서열을 시행한 결과 164번째 CTT가 CCT (leucine→proline)로 치환되는 돌연변이가 확인되었다(Fig. 4). 신이식후 발생한 당뇨병 환자이면서 SSCP상 엑손 7에 변이를 보인 환자에서 유전자 염기서열을 시행한바 엑손 7의 3' 끝으로부터 39 염기 떨어진 곳에 Base C/T의 insertion

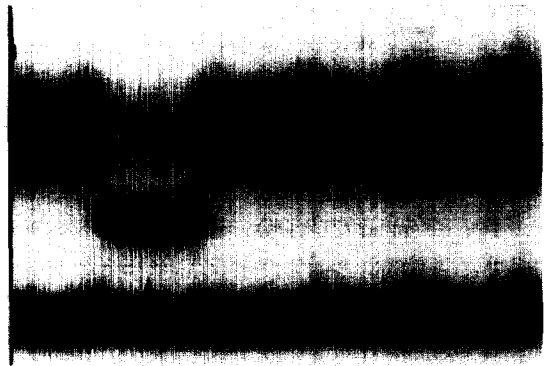


Fig. 2. SSCP analysis of the exon 7. The abnormal band is indicated with an arrow.

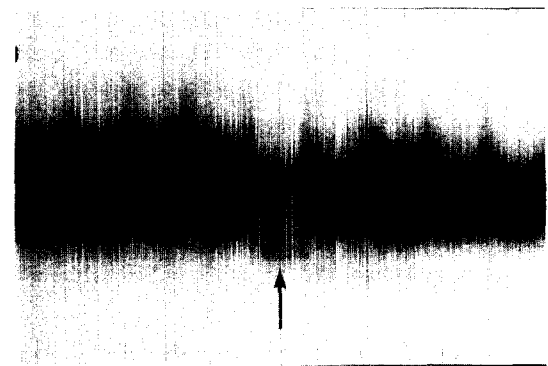


Fig. 3. SSCP analysis of the exon 9. The abnormal band is indicated with an arrow.

Table 2. Summary of Sequence Variations of Glucokinase Gene in Korean subjects with GDM, PTDM and controls

Position	Codon	Sequence	Amino acid
Exon 5	164	CTT→CCT	Leu→Pro
Intron 7		C/T insertion 39 bp downstream from 3'-end	
Intron 9		8 bp downstream from 3'-end GCCCGCC→GCCTGCC	

이 확인되었다 (Fig. 5). 정상 대조군에서는 염기서열 확인 결과 엑손 9 부위의 SSCP 변이는 엑손 9의 3' 끝으로부터 8 염기가 떨어진 곳이 G→C로 치환된 염기서열 이상이 확인되었다.

3. 돌연변이를 나타낸 환자의 임상적 특징

신이식후 발생한 당뇨병환자 58예 중 2예 (3.2%)에서 돌연변이가 관찰되었는데 1예는 엑손 5에서

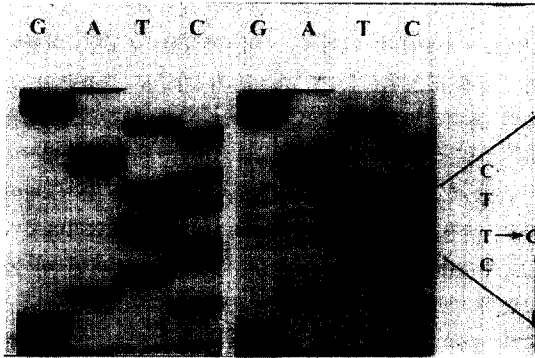


Fig. 4. The missense mutation in the exon 5.

관찰되었고 1예는 인트론 7에서 변이가 관찰되었다 (Table 2).

엑손 5 돌연변이 신이식후 발생한 당뇨병 환자는 35세 남자로서 키 165cm, 몸무게 55kg (이상체중 94%) 이었으며 신이식 전에는 정상 혈당을 유지하고 있었으나 이식 후 당뇨병이 발현되었다. 신이식후 발생한 당뇨병 진단시 공복 및 식후 2시간 혈당이 133, 289mg/dl 이었고 C-peptide는 4.03, 5.40ng/ml 이었으며 현재 식사요법으로 혈당 조절 중이다. 엑손 5에 대해 그의 가족들도 PCR을 이용한 증폭과 SSCP 분석을 시행하였는데 그의 가족 2명에서 같은 변이가 발견되었으며 (Fig. 6) 현재 당뇨병을 갖고 있지는 않았다.

신이식후 발생한 당뇨병 환자이면서 인트론 7에 변이를 보인 환자는 49세 남자로서 키 165cm, 몸무게 67kg (이상체중 112%) 이었으며 신이식 전에는 정상 혈당을 유지하고 있었으나 이식 후 당뇨병이 발현되었다. 신이식후 발생한 당뇨병 진단시 공복 및 식후 2시간 혈

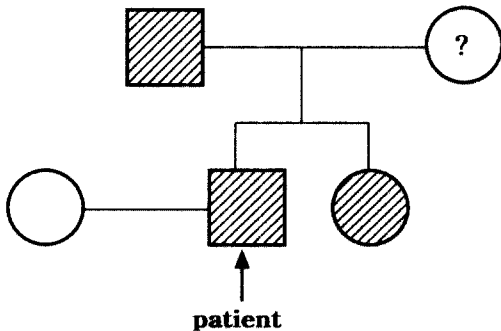


Fig. 6. The pedigree of the patient with glucokinase gene mutation in the exon 5. The hatched symbol indicates family members with mutation.

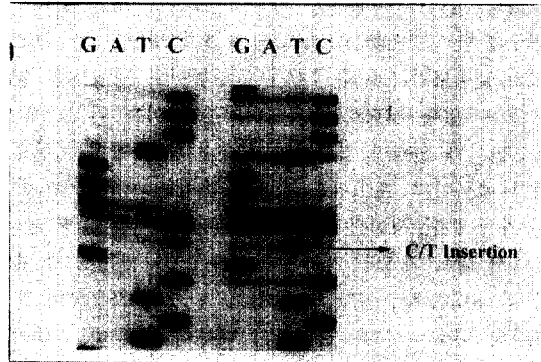


Fig. 5. The insertional mutation in the intron 7.

당이 70, 114mg/dl 이었고 C-peptide는 1.03, 1.26ng/ml 이었으며 현재 경구 혈당 강하제로 혈당 조절 중이다. 엑손 7에 대해 그의 가족들도 PCR을 이용한 증폭과 SSCP 분석을 시행하였는데 그의 가족 2명에서 같은 변이가 인트론 7부위에서 발견되었으며 (Fig. 7) 당뇨병을 갖고 있지 않았다.

고 찰

인슐린 비의존형 당뇨병의 발병원인으로서 유전적 요소가 매우 중요한 역할을 한다는 것은 다음의 몇 가지 관찰로서 이미 잘 알려져 있는데 첫째, 비슷한 거주 환경에 사는 서로 다른 인종간에 현저한 유병율의 차이가 있다는 보고¹⁵⁾, 남태평양 제도의 원주민이나 Pima 인디언 등 특정 지역의 인구집단에서 유별나게 높은 NIDDM의 발병율을 보이고¹⁶⁾, 일관성 쌍생아에 관한 연구에서 인슐린 비의존형 당뇨병에서는 50-100%의 질병 일치율을 보이고¹⁷⁾, 당뇨병은 가족 내에

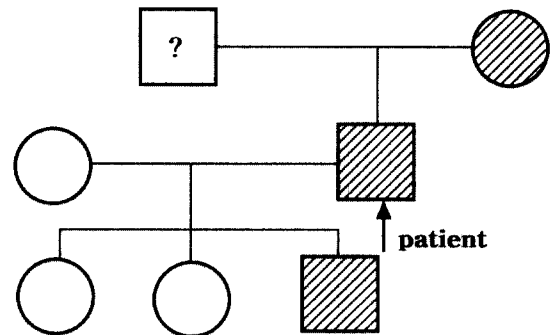


Fig. 7. The pedigree of the patient with glucokinase gene mutation in the intron 7. The hatched symbol indicates family members with mutation.

다발 한다는 사실들은 유전적 병인에 관한 중요한 증거라 할 수 있겠다. 이러한 유전적 병인의 한 원인으로 글루코키나제 유전자의 돌연변이도 당뇨병을 일으킬 수 있을 것으로 생각되어지는데 이는 이 효소의 돌연변이가 인슐린 저항성과 인슐린 분비 장애를 일으키기 때문이다. 포도당은 인슐린 분비를 자극할 수 있는 가장 주된 생리적 자극으로 먼저 간과 췌장 베타세포에서 대사 과정을 거치는데 글루코키나제는 간과 췌장 베타세포에서 해당 과정의 첫 단계에 작용하여 포도당의 이용 속도를 결정하기 때문이다. 원래 글루코키나제는 간에서 당원합성에 관계된 포도당 인산화 효소로 발견되었으며^{18, 19)} 이후 크로마토그래피법으로 췌장 글루코키나제의 분리에 성공하였으며²⁰⁾, 공복 시나식이 섭취 후와 같은 생리적인 당 농도 변화에 효소 활성도가 급격히 달라짐이 밝혀져 췌장의 포도당 수용체 역할을 할 것으로 생각되어졌다¹⁸⁾. 또한 글루코키나제는 포도당 외 다른 당류는 기질로 쓰지 않는 엄격한 기질 특이성을 가지고 있음이 발견되었고^{21, 22)} 이 후 글루코키나제 c-DNA가 합성되었는데^{23, 24)} 간의 글루코키나제는 인슐린 량에 의해 활성이 증가되고 췌장의 글루코키나제는 인슐린 증가에 의해 오히려 활성이 낮아짐이 발견되어²⁵⁾ 간의 글루코키나제는 인슐린에 의해 활성도가 좌우되고 췌장의 글루코키나제는 혈당에 의해 활성이 변화하여 세포의 당대사와 더불어 혈당 수준에 맞는 인슐린 분비를 매개하는 대사 신호가 됨이 밝혀졌다.

글루코키나제 유전자 돌연변이에 대한 연구는 프랑스 MODY 가족에서의 279번째 코돈인 GAG(Glutamic acid)이 GAT(Thymidine)으로 치환된 missense 돌연변이가 발표된 이후¹³⁾ 40여 종류의 돌연변이가 현재까지 보고되고 있으며 MODY 환자에서 60%, NIDDM 환자에서 5% 정도의 변이가 보고되고 있다. 그러나 이 모두가 글루코키나제의 활성도에 영향을 미치는지는 많은 연구가 되어있지 않은 상태이나 엑손 5, 6, 7, 8번 엑손의 10여개의 돌연변이가 단백질 구조에 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있다^{26, 27)}. 본 연구에서는 엑손 5에서 SSCP상 돌연변이가 발견되어 유전자 염기서열을 시행한 결과 164번째 코돈 CT T(Leucine)이 CCT(Proline)으로 치환되는 돌연변이가 확인되었다. 이는 전 세계적으로 보고되지 않은 돌연변이로서 건강한 대조군 45명에서는 발견되지 않았다.

글루코키나제는 간과 췌장에서 해당작용의 첫 번째 단계에 작용하여 간에서는 비 산화성 포도당 대사에 관여하며 췌장에서는 포도당 감지 기구로 작용하여 인슐린 분비에 관여한다. 글루코키나제는 단량체로 작용하기 때문에²⁸⁾ 이 돌연변이 단백질이 정상 기능을 하는 효소에 부착하여 글루코키나제의 주요한 음성 제어기로 작용할 것 같지 않지만, 만약 글루코키나제가 GLUT (glucose transporter)와 관련되어 있다면 이 돌연변이 단백질은 포도당의 세포막 이동을 억제하는 주요한 음성 제어기로 작용할 가능성이 있다²⁹⁾. 이러한 사실은 글루코키나제의 NH₂ 말단 부위에 높은 전하를 가진 아미노산이 풍부하게 존재하고 있어 다른 어떤 효소와의 정전기적인 상호 작용의 가능성이 GLUT와의 관련을 추측하게 한다. 또한 글루코키나제 활성도의 감소는 췌장 베타 세포와 간 세포에서 ATP/ADP 비율을 바꾸기 때문에 인슐린 분비 과정의 또 다른 기전을 방해할 수도 있을 것으로 추측할 수 있다.

글루코키나제의 구조는 효모 헥소키나제와 40%에 해당하는 140개의 잔기가 같기 때문에³⁰⁾ 효모 헥소키나제 수정체 구조의 알파 나선구조 및 베타 가닥은 효모 헥소키나제 같은 배열을 하는 것으로 생각되어진다³¹⁾. 이 구조에 따르면 글루코키나제는 소엽과 대엽으로 나누어져 있고 이 사이에 깊은 틈새가 존재하고 포도당이 이 틈새 바닥에 결합하면 두 엽 사이에 존재하는 틈새를 닫는 거대한 구조적 변화가 일어난다³²⁾. 이때 글루코키나제는 인산염기를 ATP로 부터 물과 포도당의 특정한 수산화기에 전달하는데 이러한 반응이 물보다 포도당에서 5×10⁶배 빠르게 일어나는 현상을 설명해준다. 즉 이 구조적 변화에 의해 소수성 환경이 만들어져 물을 밀어낸 후 인산 염기 수용체가 ATP의 인산 염기 가까운 곳에 위치하게 된다²⁸⁾. 본 연구에서 밝혀진 코돈 164은 소엽의 베타 시트 7에 위치하여 이러한 구조적 변화에 관여할 것으로 생각되어지며 이곳에서의 돌연변이는 포도당 농도에 대한 생리적 반응의 역치를 높일 수도 있을 것으로 생각되지만 이를 증명하기 위하여서는 좀더 구체적인 실험이 있어야 할 것으로 사려된다.

엑손 5 돌연변이 신이식후 발생한 당뇨병 환자는 35세 남자로서 신이식 전에는 정상 혈당을 유지하고 있었으나 이식 후 당뇨병이 발현된 환자로 공복 및 식후 2시간 혈당이 133, 289mg/dl 및 C-peptide는 4.03,

5.40ng/ml 이었으며 이 환자의 돌연변이는 인슐린 저항성을 증가시켰을 것으로 생각된다. 그의 가족에 대해서도 PCR을 이용한 중폭과 SSCP 분석을 시행하였는데 누이와 아버지에게도 똑같이 엑손 5에 돌연변이가 발견되어 상염색체 우성유전을 하는 것으로 생각된다. 오 등¹¹⁾이 발표한 한국인 NIDDM 환자에서 글루코키나제 유전자에 대한 SSCP 결과에서 엑손 5에 돌연변이가 있는 것으로 보고하였는데 유전자 염기서열을 시행하지 않아 돌연변이 유무를 확인할 수 없지만 엑손 5의 돌연변이는 한국인에서의 특징일 가능성을 배제할 수 없겠다.

신이식후 발생한 당뇨병은 이식한 환자에서 3-46%^{33, 34)} 정도 발병하는 것으로 되어있는데 정확한 발병 기전은 모르나 수술에 대한 스트레스, 부신 피질스테로이드, 사이클로스포린 등의 면역억제제, 이노제의 사용, 당뇨병의 병력, HLA 종류³⁵⁾ 등이 관여한다고 알려져있으며 이때 당뇨병으로 발병한 사람은 당뇨병이 생기지 않은 사람과 비교하여 볼 때 같은 용량의 약제 사용에도 불구하고 당뇨병의 발병률이 차이가 나는 것으로 미루어 볼 때 어떤 유전적 소인이 있지 않은가 추측할 수 있다.

신이식후 발생한 당뇨병환자에서 인트론 7에도 돌연변이가 발견되었는데 이 곳은 번역되지 않는 부위이고 글루코키나제 구조에 변화를 일으키지 않을 것으로 생각되지만 전사는 되므로 mRNA의 작용, 전도, 안정성, 번역률 등에 관계할 수 있기 때문에 글루코키나제의 활성에 영향을 줄 가능성도 생각할 수 있겠다.

정상 대조군에서는 1명에서 엑손 9의 3' 끝으로부터 8번째 염기가 떨어진 인트론 9에서 C→T로 치환된 변이가 발견되었으나 이는 정상인에서도 발견되는 것으로 보고되어 있으며³⁶⁾ 그 외 대조군에서는 돌연변이가 관찰되지 않는다.

Eto 등³⁷⁾과 오 등¹¹⁾은 1-β 부위에 돌연변이를 보고하였는데 본 연구에서는 돌연변이가 있는 부위가 primer 안에 포함되지 않았다. 하지만 이 부위의 돌연변이 빈도는 Eto 등에 의하면 일본인 정상대조군의 4.3%, 인슐린 비의존형 당뇨병 환자에서 5.3%를 보고하여 정상인과 당뇨병 환자간에 차이가 없다고 보고하였으며, 번역되지 않는 부위이기 때문에 기능적 장애를 초래할 가능성은 적을 것으로 생각된다.

신이식후 발생한 당뇨병에서는 모두 2명에서 돌연

변이가 발견되어 (3.4%) 통계학적인 의미가 있을 것으로 생각되지 않지만 대상 환자가 적어 앞으로 좀더 연구가 진행되어야 될 것으로 생각한다. 하지만 신이식 후 발생한 당뇨병 환자의 가족에서도 상 염색체 우성의 형태로 돌연변이가 발견되었고 그 가족들은 당뇨병이 없는 것으로 미루어보아 이 글루코키나제의 돌연변이가 이 효소의 기능에 어느 정도 결함을 초래하고 있다가 신이식 수술 후 스트레스나 면역억제제 등에 의해, 신이식 비당뇨군과 달리, 당뇨병이 발현되었을 것으로 추측할 수 있겠다.

인슐린 비의존형 당뇨병환자 및 임신성 당뇨병환자에서는 돌연변이가 발견되지 않았으며 이는 인슐린 비의존형 당뇨병환자와 임신성 당뇨병환자에서 글루코키나제 돌연변이가 드물게 관찰된다는 보고^{38, 39)}를 고려할 때 좀더 많은 환자를 대상으로하는 연구가 있어야 될것으로 사려된다.

결 론

이상의 결과를 볼 때 글루코키나제의 유전적 돌연변이는 한국인에 있어서 인슐린 비의존형 당뇨병 및 신이식후 발생한 이차성 당뇨병에서 주요한 원인은 아닐 것으로 생각되고 본 연구에서 발견된 돌연변이와 당뇨병 발병 사이의 관계를 규명하기 위하여 좀더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

인슐린 비의존형 당뇨병은 인슐린의 상대적인 결핍과 인슐린 저항성에 의하여 발생하는 것으로 환경적 요인과 함께 유전적 요소가 같이 관여하여 발병한다. 하지만 정확한 유전양식이나 유전인자에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 현재까지 포도당 대사 및 인슐린 분비에 관계되는 여러 유전자에 대해 연구가 진행되어 많은 돌연변이를 밝혀내었으나 인슐린 비의존형 당뇨병의 원인 중 일부만이 설명되고 있을 뿐이다. 이 중에서 글루코키나제 유전자는 인슐린 비의존형 당뇨병을 일으키는 유전자의 하나로 생각되고 있는데 이는 인슐린 저항성과 인슐린 분비 장애를 일으킬 수 있기 때문이다. 본 연구에서는 인슐린 비의존형 당뇨병 환자 39명, 신이식후 발생한 당뇨병 환자 58명, 임신성 당뇨병 환자 2명 및 정상 대조군 45명 등 144명에 대해 글루코키나제의 엑손을 단일쇄 변이분석 방

법으로 일차 검사를 하였다, 이때 이상이 있는 엑손은 염기서열을 확인하였으며 돌연변이의 존재가 확인된 환자의 경우, 그 가족도 돌연변이 유. 무에 대해 분석함으로써 한국인에게 있어 인슐린 비의존형 당뇨병, 임신성 당뇨병 및 신이식후 발생한 당뇨병에서 글루코키나제 돌연변이와의 연관성과 그 유전양상에 대하여 분자생물학적 접근을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 신이식후 발생한 당뇨병 환자에서는 58예 중 2예 (3.2%)에서 돌연변이가 관찰되었는데 엑손 5에 1예, 인트론 7에 1예의 변이가 관찰되었으며 정상 대조군에서는 인트론 9에 1명 있었다.

2. 엑손 5에 나타난 변이는 유전자 염기서열을 시행한 결과 코돈 164번째 CTT가 CCT(leucine→proline)로 치환되는 돌연변이가 확인되었다. 엑손 5에 돌연변이를 갖고있는 신이식후 발생한 당뇨병 환자의 가족들도 단일쇄 변이분석을 시행하였는데 그의 가족 2명에서 같은 변이가 관찰되었다.

4. 신이식후 발생한 당뇨병 환자에서 단일쇄 변이분석상 인트론 7에 변이는 유전자 염기서열을 확인한바 엑손 7의 3' 끝으로 부터 39 염기 떨어진 곳에 Base C/T의 삽입이 관찰되었다.

5. 정상 대조군 45예에서는 엑손 9에서 염기서열 이상이 발견되었으며 염기서열 분석결과 엑손 9의 3' 끝으로 부터 8 염기가 떨어진 인트론에서 G→C로 치환된 염기서열 이상이 관찰되었다. 하지만 이 부위는 정상인에서도 발견되는 변이로 알려져 있다.

이상의 결과를 고려할 때 한국인 인슐린 비의존형 당뇨병 및 신이식후 발생한 당뇨병에서 글루코키나제의 유전적 돌연변이는 주요한 병인은 아닐 것으로 생각되나 향후 이를 규명하기 위해서는 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

핵심 되는 말 : 글루코키나제, 인슐린 비의존형 당뇨병, 신이식후 발생한 당뇨병

=Abstract=

Glucokinase gene mutation in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), and secondary diabetes in Koreans

Jae Hyun Nam, M.D., Hyun Chul Lee, M.D.
Youn Euy Kim, M.S., Suk Ho Kwon, M.D.
Yong Suk Yoon, M.D., Suk Won Park, M.D.
Bong Su Cha, M.D., Young Jun Won, M.D.
Young Duk Song, M.D., Eun Jig Lee, M.D.
Sung Kil Lim, M.D., Kyung Rae Kim, M.D.
and Kap Bum Huh, M.D.

*Department of internal Medicine, Yonsei university
College of medicine, Seoul, Korea*

Objectives : Mutations in the glucokinase (GCK) gene are considered a possible cause of maturity-onset diabetes of the young. The purpose of this study was to evaluate the contribution of this gene to the development of non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), gestational diabetes mellitus (GDM) and post-renal transplantation diabetes mellitus (PTDM).

Method : Identification of GCK mutation was attempted on 39 NIDDM patients, 2 GDM patients and 58 selected renal allograft recipients with PTDM and 45 normal controls. The exons in the GCK gene were examined by polymerase chain reaction (PCR), followed by analysis of single-stranded DNA conformational polymorphism (SSCP). The abnormal bands were also confirmed by DNA sequencing analysis. The exons of affected family members were also investigated for mutations of the GCK gene.

Results : Two of the 58 PTDM patients (3.4%) were found to have GCK mutations. One had the mutation on exon 5 and the other on intron 7. One control subject had the mutation on intron 9. The mutation of exon 5 was identified as a substitution of CCT(proline) for CTT (leucine) at codon 164, which has not ever reported before. The family members of the PTDM patient with mutation of exon 5 were analyzed by PCR followed by SSCP, and two of them revealed the same mutation. The abnormal band on the SSCP analysis of exon 7 was identified as the insertion of base C/T at the 39th nucleotide in intron 7. Two family members of this patients also had same band on SSCP. The one mutation of 45 normal controls was CT located at the 8th nucleotide in intron 9, which was a common polymorphism.

Conclusion : We found GCK mutations in subjects with PTDM and we speculate that these mutations may be one of the contributing cause of PTDM.

Key Words : glucokinase, non-insulin-dependent diabetes mellitus, post-renal transplantation diabetes mellitus

REFERENCES

- 1) 오승준, 우정택, 김덕윤, 양인명, 김성운, 김진우, 김영설, 최영길, 팽정령: 인슐린 비의존형 당뇨병에서 글루코키나제 유전자 변이에 대한 연구. *대한내과학회지* 50: 344-355, 1996
- 2) Rotter JL, Rimoin DL: *Diabetes Mellitus: the search for genetic marker. Diabetes Care* 2:215-226, 1979
- 3) O'Rahilly S, Wainscoat JS, Turner RC: *Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: new genetics for old nightmares. Diabetologia* 31:407-414, 1988
- 4) Knowler WC, Pettitt DJ, Bennett PH, Williams RC: *Diabetes mellitus in the Pima Indians: genetic and evolutionary considerations. Am J Phys Anthropol* 62: 107-114, 1983
- 5) Fajans SS: *Scope and heterogenous nature of MODY. Diabetes Care* 13:49-64, 1990
- 6) Owerbach D, Nerup J: *Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene in diabetes mellitus. Diabetes* 31:275-277, 1982
- 7) Elbein SC, Corsetti L, Ulrich A, Permutt MA: *Multiple restriction fragment length polymorphisms at the insulin receptor locus: a highly informative marker for linkage analysis. Proc Natl Acad Sci USA* 83:5223-5227, 1986
- 8) Cox NJ, Xiang KS, Bell GI, Karam JH: *Glucose transporter gene and non-insulin dependent diabetes mellitus. Lancet* 2:793-794, 1988
- 9) Li SR, Baroni MG, Obelbarum RS, Stock J, Galton DJ: *Association of genetic variant of the glucose transporter with non-insulin dependent diabetes mellitus. Lancet* 2:368-370, 1988
- 10) Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV: *Maternally transmitted diabetes and deafness with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. Nature Genetics* 1:11-15, 1992
- 11) Xiang KS, Cox NJ, Sanz N, Huang P, Karam JH, Bell GI: *Insulin-receptor and apolipoprotein genes contribute to development of NIDDM in Chinese Americans. Diabetes* 38:17-23, 1989
- 12) Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali P, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougousse F, Tanizawa Y, Weisenbach J, Beckmann JS, Lathrop GM, Passa P, Permutt MA: *Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature* 356: 162-164, 1992
- 13) Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa P, Froguel P, Cohen D: *Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature* 356:721-722, 1992
- 14) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), 2nd Ed, 1989*
- 15) Zimmet P: *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes-an epidemiological overview. Diabetologia* 22:399-411, 1982
- 16) Zimmet P, Taft P, Guinea A, Guthrie W, Thoma K: *The high prevalence of diabetes mellitus on a Central Pacific Island. Diabetologia* 13:111-115, 1977
- 17) Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA: *Diabetes in identical twins. a study of 200 pairs. Diabetologia* 20: 87-93, 1981
- 18) Sharma C, Manjeshwar R, Weinhouse S: *Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotransferases of rat. J Biol Chem* 238: 3841-3845, 1963
- 19) Walker DG, Rao S: *The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver. Biochem J* 90: 360-368, 1964
- 20) Meglasson MD, Matschinsky FM: *Purification of the putative islet cell glucose sensor GK from isolated pancreatic islet and insulinoma tissue. J Biol Chem* 259:343-346, 1984
- 21) Bedoya FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D, Matschinsky FM: *The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. Diabetes* 35:61-67, 1986
- 22) Meglasson MD, Matschinsky FM: *New perspectives on pancreatic islet glucokinase. Am J Physiol* 246:E1-E13, 1984
- 23) Andreone TL, Printz RL, Pilkis SJ, Magnuson MA, Granner DK: *The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA. J Biol Chem* 264:363-369, 1989
- 24) Tanizawa Y, Koranyi LI, Welling CM, Permutt MA: *Human liver glucokinase gene: cloning and sequence determination of two alternatively spliced cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA* 88:7294-7297, 1991
- 25) Bedoya FJ, Matschinsky FM, Shimizu T, O'Neil JJ, Appel MC: *Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat. J Biol Chem* 261:10760-10764, 1986
- 26) Hughes SD, Johnson JH, Quaade C, Newgard CB: *Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. Proc Natl Acad Sci USA* 89:688-692, 1992
- 27) Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D, Patel P, Lo Y-MD, Hattersley AT, Luthman H, Wedellin A, Charles R, Harrison RW, Weber IT, Bell GI, Pilkis SJ: *Glucokinase mutations associated with non insulin*

- dependent diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationship. Proc Natl Acad Sci USA 90:1932-1936, 1993*
- 28) Stoffel M, Froguel P, Takeda J, Zouali H, Vionnet N, Nishi S, Weber IT, Harrison RW, Pilkis S, Lesage S, Vaxillaire M, Velho G, Sun F, Iris F, Passa PH, Cohen D, Bell GI: *Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA 89:7698-7702, 1992*
- 29) unger RH: *Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic β cells. Science 251:1200-1205, 1991*
- 30) Bennett WS Jr, Steitz TA: *Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. Detailed comparisons of conformation and active site configuration with the native hexokinase B monomer and dimer. J Mol Biol 140:211-230, 1980*
- 31) Anderson CM, McDonald RC, Steitz TA: *Sequencing a protein by X-ray crystallography. Interpretation of yeast hexokinase B 2.5 Å resolution by model building. J Mol Biol 123:1-13, 1978*
- 32) Anderson CM, Zucker FH, Steitz TA: *Space-filling models of kinase clefts and conformation change. Science 204:375-380, 1979*
- 33) Gunnarsson R, Arner P, Lundgren G, Magnusson G, Ostman J, Groth CG: *Diabetes mellitus—a more common than believed complication of renal transplantation. Transplant Proc 11:1280-1281, 1979*
- 34) McGeowon MG, Douglas JF, Brown WA, Donaldson RA, Kennedy JA, Loughridge WG, Mehta S, Nelson SD, Doherty CC: *Advantages of low dose steroid after transplantation. Transplantation 29:287-289, 1980*
- 35) Ahn KJ, Kim YS, Lee HC, Park K, Huh KB: *Clinical characteristics and possible risk factors in postrenal transplant diabetes mellitus. Transplant Proc 24:1581-1582, 1992*
- 36) Tanizawa Y, Matsutani A, Chiu KC, Permutt MA: *Human glucokinase gene: isolation, structural characterization, and identification of a microsatellite repeat polymorphism. Mol Endocrinol 6:1070-1081, 1992*
- 37) Eto K, Sakura H, Shimokawa K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T: *Sequence variations of the glucokinase gene in Japanese subjects with NIDDM. Diabetes 42:1133-1137, 1993*
- 38) Nishi S, Hinata S, Matsukage T, Takeda J, Ichiyama A, Bell GI, Yoshimi T: *Mutations in the glucokinase gene are not a major cause of late-onset type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. Diabetic Medicine 11:193-197, 1994*
- 39) Stoffel M, Bell KL, Blackburn CL, et al: *Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. Diabetes 42:937-940, 1993*