

미토콘드리아 DNA상의 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 연관성 분석

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 중앙대학교 자연과학대학 생명과학과²

한태수¹ · 최지혜^{1,2} · 박지나^{1,2} · 이광호² · 박애자¹

Genetic Association of Mitochondrial DNA Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus

Tae Su Han¹, Jee-Hye Choi^{1,2}, Jina Park^{1,2}, Kwang-Ho Lee², Ae Ja Park¹

¹Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine,

²Department of Life Science, Chung-Ang University College of Natural Science, Seoul, Korea

Abstract

Background: Although many single nucleotide polymorphisms (SNPs) of mtDNA have been found to be associated with type 2 diabetes mellitus, the results of studies using different population samples and different methods are mixed. Therefore, we conducted a genetic association study of mtDNA SNPs and type 2 diabetes mellitus in a Korean sample and compared our results with those of studies conducted in other human populations.

Methods: A total of 298 blood samples from 147 type 2 diabetic patients and 151 normal controls were surveyed for SNPs via PCR directed sequencing. Sequencing analyses were performed using the SeqMan module of the DNASTAR program. The identified SNPs were compared to previously reported SNP lists on NCBI and V-mitoSNP.

Results: A total of 24 SNPs were identified in the MT-RNR2, MR-TL1 and MT-ND1 mtDNA genes in Korean type 2 diabetes mellitus patients and normal controls. The SNPs identified in the Korean sample were not closely associated with the type 2 diabetes mellitus phenotype, a significantly different result from those previously observed in European, Chinese and Japanese samples. Additionally, a haplotype and prevalence analysis could not detect any differences between the type 2 diabetes mellitus patients and normal controls.

Conclusion: The 24 mtDNA SNPs were not associated with type 2 diabetes mellitus risk in our Korean sample. The results of the present study support the possibility that mtDNA SNPs have a differential effect on the risk of type 2 diabetes mellitus according to geographical origin. (Korean Diabetes J 33:382-391, 2009)

Key words: Mitochondrial DNA, Single nucleotide polymorphism, Type 2 diabetes mellitus

서 론

진핵생물의 미토콘드리아는 탄수화물과 지방산의 산화적 인산화과정에 중요한 세포 소기관으로 원핵생물의 내부 공생 기작에 의해 유래되었을 것이라고 잘 알려져 있다. 이런 미토콘드리아는 진핵생물의 genomic DNA와는 별개의

그들 자신만의 유전물질을 가지고 있으며 사람의 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)의 경우 16569 bp의 원형구조로 이루어져 있고 산화적 인산화과정에 필요한 13개의 단백질을 코딩하는 유전자와 미토콘드리아 단백질을 합성에 필요한 ribosomal RNA, tRNA 유전자를 가지고 있다¹⁾. 최근 mtDNA의 양적, 질적 이상이 당뇨병 및 인슐

접수일자: 2009년 7월 1일, 통과일자: 2009년 8월 24일

교신저자: 박애자, 중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실, E-mail: ajcp@unitel.co.kr

* 본 연구는 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-D00518).

린저항증의 원인 유전자 중의 하나라고 보고되었는데 특히 미토콘드리아 관련 유전자들의 다형성이 미토콘드리아 기능 저하를 유발하고 따라서 에너지 생성이 저하되어 당뇨병에 대한 감수성에 영향을 미칠 것으로 보고되어 있다²⁻⁴⁾. 미토콘드리아의 산화적 인산화 기능의 저하와 당뇨병과의 상관성을 살펴보면, 당뇨병과 밀접한 관련이 있는 인슐린이 분비소낭에 저장되었다가 외포작용을 통해 이자의 β 세포에서 방출되는데 이런 외포작용에 미토콘드리아 대사에 의해 생성된 ATP가 작용하여 ATP sensitive potassium channel을 닫고 세포막을 탈분극화 시켜 voltage sensitive Ca^{2+} 농도를 증가시킴으로써 인슐린의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 따라서 이런 미토콘드리아의 산화적 인산화과정과 관여하는 유전자의 돌연변이는 혈중 포도당 농도 조절 실패와 밀접한 관련이 있다. 또한 제2형 당뇨병의 발병과 관련한 mtDNA 분석의 중요성은 제2형 당뇨병의 발병이 가계 내에서 모계 편중 현상을 갖는다는 많은 역학보고들에 의해 주목되었다⁶⁻⁹⁾. 제2형 당뇨병과 관련된 mtDNA의 single nucleotide polymorphism (SNP)나 일배체형(haplotype)의 경우 mtDNA 자체가 모계유전양상을 갖는 특징을 가지고 있기 때문에 앞서 언급한 제2형 당뇨병의 모계편중 양상을 설명하는데 중요한 역할을 할 것이다. 최근 이러한 mtDNA의 다형성과 제2형 당뇨병 발병과의 관련성을 분석하기 위해 다양한 SNP 및 일배체형이 분석되었다. 아시아의 경우 중국과 일본을 중심으로 3243 (A/G), 3426 (A/G), 8684 (C/T), 16189 (T/C) SNP와 같이 MT-TL1 (tRNA leucine 1)과 MT-ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1), MT-ATPase 6 유전자와 MT-D loop 부위의 SNP가 제2형 당뇨병과 관련되어 있다고 보고된 바 있다¹⁰⁾. 그러나 지금까지 알려진 SNP와 제2형 당뇨병과의 상관성은 인종이나 민족에 따라 다르게 관찰되었다¹¹⁻¹⁹⁾. 따라서 기존에 보고되어있는 제2형 당뇨병 관련 mtDNA의

SNP에 대한 한국인에서의 제2형 당뇨병과의 상관관계는 다시 점검되어야 할 것이다. 본 논문에서는 이러한 mtDNA의 SNP와 한국인 제2형 당뇨병환자 사이에서의 상관성 분석을 통해서 한국인의 제2형 당뇨병의 발병에 관여하는 mtDNA SNP 및 일배체형을 발견하고 이를 통해 제2형 당뇨병의 발병기전을 분자유전학적 관점에서 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 2006년 3월부터 2006년 12월까지 중앙대학교병원내 당뇨병으로 입원하거나 내과 외래를 방문하였던 환자들과 건강검진센터를 방문한 정상인들 중 유전자연구에 동의한 사람들을 대상으로 WHO 1999의 진단 기준을 적용하여 선별하였다. 본 연구진이 선별한 실험군은 정상인 남자 63명, 여자 88명, 총 151명과 환자군으로는 남자 35명, 여자 112명 총 147명이다. 수집된 298명에 대한 임상 정보는 Table 1과 같다.

2. 연구 방법

1) 신체 측정 및 생화학적 검사

제2형 당뇨병환자들에서 문진과 이학적 검사를 통하여 체중 및 신장을 측정하였으며 이로부터 BMI (body mass index)를 산출하였으며, 제2형 당뇨병환자들과 정상인들의 내원 당시 채취한 혈액을 사용하여 공복 시 혈당(fasting blood glucose), 당화혈색소(HbA1c), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL-cholesterol), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL-cholesterol), 공복 시 혈청인슐린 농도(fasting serum insulin) 등을 측정하였다.

Table 1. Clinical characteristic of Korean T2DM patients and normal control subjects

	T2DM subjects		Normal subjects	
	Male (n = 35)	Female (n = 112)	Male (n = 63)	Female (n = 88)
Fasting blood glucose (mg/dL)	138 ± 56.6	112 ± 43.8	89 ± 15	91 ± 8.1
HDL-cholesterol (mg/dL)	44 ± 13	49 ± 13	52 ± 11	57 ± 13
LDL-cholesterol (mg/dL)	102 ± 37.1	112 ± 26.1	94 ± 24	94 ± 23
HbA1c (%)	7 ± 1.93	6 ± 1.41	5.1 ± 0.3	4.9 ± 1.1
BMI (kg/m ²)	24 ± 3.77	24 ± 4.45		
Fasting serum insulin (mU/L)	6 ± 6.09	6 ± 9.61		

Data are means ± SD. BMI, body mass index; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

2) DNA 추출

채취한 혈액은 EDTA로 처리된 용기에 채혈하고 Genomic DNA extraction kit (RBC, Taipei, Taiwan)을 이용하여 DNA를 추출하였으며 추출된 DNA는 -20℃에서 보관하였다.

3) 유전자형 분석

이미 알려져 있는 제2형 당뇨병관련 SNP 부위를 중심으로 DNASTAR program을 이용하여 primer를 제작하였으며 primer 염기서열은 sense primer: 5'AATAACTTGACCAACGG AACA-3', antisense primer: 5'TAGTAGAAGAGC GATG GTGAGAGC-3'와 같다. 제작된 primer는 10 pmole/uL의 농도로 희석하여 총 반응 용액 20 uL에 각 1 uL를 사용하였다. 그 외에 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위해 필요한 Taq polymerase나 buffer, dNTP, MgCl₂는 PCR premix Premix (Bioneer Co., Seoul, Korea)를 이용하였으며 94℃ 5분간 전변성 시킨 후 94℃ 40초, 53℃ 40초, 72℃ 40초로 35 cycle을 증폭하고 72℃에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 통하여 확인한 후 PCR purification kit (RBC, Taipei, Taiwan)을 이용하여 정제하여 마크로젠(Macrogen Co., Seoul, Korea)을 통해 염기서열분석을 수행하였다.

4) SNP 분석

각 검체들로부터 얻어진 염기서열 분석 결과는 DNASTAR software의 SeqMan program을 이용하였으며 Revised Cambridge Reference Sequence 염기서열을 기준으로 배열하여 SNP 위치를 확인하고 크로마토그램 분석을 통해 SNP를 결정하였다. 발견된 SNP는 NCBI 사이트와 visualization of human mitochondrial SNP (V-mitoSNP) 사이트를 이용하여 기존에 보고된 SNP 결과와 비교하였다²⁰⁾.

3. 통계 및 분석

SPSS version 12.0 (SPSSInc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 환자군과 대조군에 따른 유전자형과 대립유전자의 빈도 차이에 대한 chi-square 검정 및 승산비(odds ratio, OR), 95% 신뢰구간(confidence interval, CI) 분석을 실시하였다. 모든 통계적 검정은 유의수준 5% 하에서 실시하였다. 연구대상수에 따른 통계 검정력(statistical power)은 G*Power 3.1.0 (Franz Faul, University kiel, Germany)을 이용하여 효과 크기(effect size)를 0.2, 유효수준(α)은 0.05으로 하여 계산하였다.

결 과

1. 제2형 당뇨병과 관련된 SNP의 유전자형과 대립인자 빈도에 대한 분석

한국인 제2형 당뇨병환자군 147명과 정상인군 151명의 혈액샘플에서 추출한 DNA를 이용하여 제2형 당뇨병과 연관되어 있다고 보고된 mtDNA 부위인 MT-RNR2와 MT-TL1, MT-ND1 총 3개의 유전자부위를 포괄하는 PCR primer를 제작하여 염기서열 분석을 시도하였다. 발견된 SNP는 MT-RNR2 유전자에서 6개 [3010 (G/A), 3145 (A/G), 3169 (C/T), 3202 (T/C), 3203 (A/G), 3206 (C/T)], MT-ND1 유전자에서 18개 [3308 (T/C), 3316 (G/A), 3336 (T/C), 3343 (A/G), 3378 (A/G), 3391 (G/A), 3394 (T/C), 3399 (A/G), 3421 (G/A), 3426 (A/G), 3447 (A/G), 3487 (C/T), 3496 (G/T), 3497 (C/T), 3520 (A/G), 3523 (A/G), 3535 (T/C), 3537 (A/G)], 총 24개가 발견되었으며 MT-TL1 유전자에서는 어떠한 SNP도 발견되지 않았다 (Table 2 and 3). 또한 발견된 SNP 중 7개 [3010 (G/A), 3206 (C/T), 3316 (G/A), 3336 (T/C), 3394 (T/C), 3497 (C/T), 3537 (A/G)]의 SNP는 제2형 당뇨병환자군과 정상인군 사이에서 빈도의 차이는 있으나 두 집단 모두에서 발견되었으며 나머지 17개 SNP 중 12개[3145 (A/G), 3169 (C/T), 3202 (T/C), 3203 (A/G), 3308 (T/C), 3343 (A/G), 3421 (G/A), 3426 (A/G), 3447 (A/G), 3496 (G/T), 3520 (A/G), 3523 (A/G)]는 정상인군에서만 발견되었고, 5개 [3378 (A/G), 3391 (G/A), 3399 (A/G), 3487 (C/T), 3535 (T/C)]는 제2형 당뇨병환자군에서만 발견되었다. 발견된 24개의 SNP 중 MT-RNR2 유전자에서 발견된 2개[3010 (G/A), 3206 (C/T)]의 SNP와 MT-ND1의 11개[3308 (T/C), 3316 (G/A), 3336 (T/C), 3378 (A/G), 3391 (G/A), 3394 (T/C), 3426 (A/G), 3447 (A/G), 3496 (G/T), 3497 (C/T), 3537 (A/G)]의 SNP는 이미 미토콘드리아 SNP의 database인 V-mitoSNP에 보고되어 있는 SNP였으며, 그 중 MT-ND1의 4개[3316 (G/A), 3394 (T/C), 3496 (G/T), 3497 (C/T)]만이 제2형 당뇨병과 관련되어 있다고 보고되었다. 그 외 본 연구에서 발견된 MT-RNR2 유전자의 4개 SNP [3145 (A/G), 3169 (C/T), 3202 (T/C), 3203 (A/G)]와 MT-ND1 유전자에서 발견된 7개[3343 (A/G), 3399 (A/G), 3421 (G/A), 3487 (C/T), 3520 (A/G), 3523 (A/G), 3535 (T/C)]의 SNP는 V-mitoSNP에 보고되어 있지 않은 새로운 SNP였다. 발견된 모든 SNP부위의 크로마토그램 분석 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 본 연구결과 관찰된 heteroplasmy는

Table 2. Identified SNPs on the MT-RNR2 gene

Gene name		MT-RNR2					
Map position (np)		1671-3228					
Description		16S ribosomal RNA					
Nucleotide change		3010	3145	3169	3202	3203	3206*
		G/A	A/G	C/T	T/C	A/G	C/T
T2DM	Major allele	101	147	147	147	147	135
	minor allele	46	0	0	0	0	11
Normal	Major allele	109	150	150	150	150	144
	minor allele	42	1	1	1	1	7

* SNP previously reported to be associated with T2DM. SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Table 3. Identified SNPs on the MT-ND1 gene

Gene name		MT-ND1																	
Map position (np)		3307-4262																	
Description		NADH Dehydrogenase subunit 1																	
Nucleotide		3308	3316 [*]	3336	3343	3378	3391	3394 [*]	3399	3421	3426	3447	3487	3496	3497	3520	3523	3535	3537
change		T/C	G/A	T/C	A/G	A/G	G/A	T/C	A/G	G/A	A/G	A/G	C/T	G/T	C/T	A/G	A/G	T/C	A/G
Amino acid		M/T	A/T				G/R	Y/H						A/S	A/V				
T2DM	Major allele	146	143	143	146	145	145	141	145	146	146	146	145	146	143	146	146	145	142
	Minor allele	0	3	3	0	1	1	5	1	0	0	0	1	0	3	0	0	1	4
NL	Major allele	150	150	150	150	151	151	143	151	149	149	150	151	150	145	149	149	151	150
	Minor allele	1	1	1	1	0	0	8	0	2	2	1	0	1	6	2	2	0	1

* SNP previously reported to be associated with T2DM. SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

총 3건이며 제2형 당뇨병환자 1개체에서 3497 SNP의 heteroplasmy가 관찰되었으며 정상인 2개체에서 3206 SNP의 heteroplasmy가 관찰되었다(Fig. 3).

2. 발견된 SNP와 제2형 당뇨병과의 관련성 분석

본 연구를 통하여 발견된 24개의 SNP 중 제2형 당뇨병 환자군과 정상인군 모두에서 발견된 7개의 SNP를 대상으로 제2형 당뇨병과의 연관성을 분석하기 위해 각 allele의 빈도를 구하여 SPSS를 통하여 교차분석한 후 OR와 95% CI를 구하고 chi-square 검정을 실시하여 연관관계를 분석하였다. 발견된 7개의 SNP는 3010 (G/A) (OR: 0.85, *P*-value: 0.511), 3206 (C/T) (OR: 0.60, *P*-value: 0.300), 3316 (G/A) (OR: 0.32, *P*-value: 0.323), 3336 (T/C) (OR: 0.32, *P*-value: 0.323), 3394 (T/C) (OR: 1.58, *P*-value: 0.434), 3497 (C/T) (OR: 1.97, *P*-value: 0.343), 3537 (A/G) (OR: 0.24, *P*-value: 0.200)으로 관찰되었다. 통계분

석결과 7개의 SNP 모두 제2형 당뇨병과 연관되어 있지 않은 것으로 나타났다(Table 4).

3. 발견된 SNP에 대한 일배체형 분석

두 집단 모두에서 발견된 7개의 SNP를 이용하여 제2형 당뇨병과의 연관성을 분석해보고자 일배체형분석을 실시하였다. 먼저 0.005 이상의 빈도를 보이는 일배체형 7개를 선별하여 OR와 95% CI 및 chi-square 검정을 시행하였다. 일배체형에 대한 제2형 당뇨병과의 연관성 분석 결과는 Table 5와 같다. 그 결과 개별 SNP 분석결과와 마찬가지로 제2형 당뇨병과의 통계상의 유의성을 관찰할 수 없었다.

4. 제2형 당뇨병환자군과 정상인군에서 SNP 발생률의 차이 분석

제2형 당뇨병환자군과 정상인군 내에서 한 개체당 발생

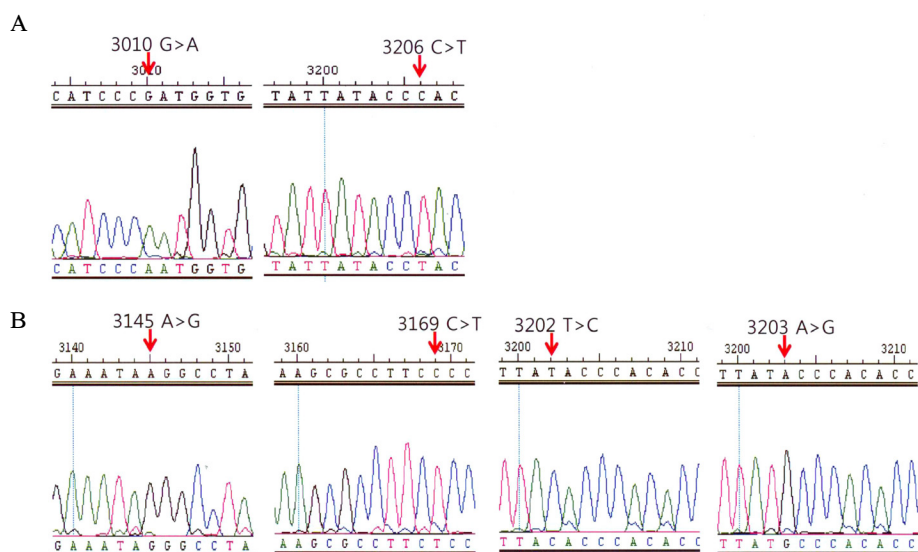


Fig. 1. Sequence results of PCR product amplified from target sequences contain SNPs on MT-RNR2 gene. The arrows indicate the variant bases. A. SNPs were observed from both T2DM and normal subjects. B. SNPs were observed from only normal subjects. SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

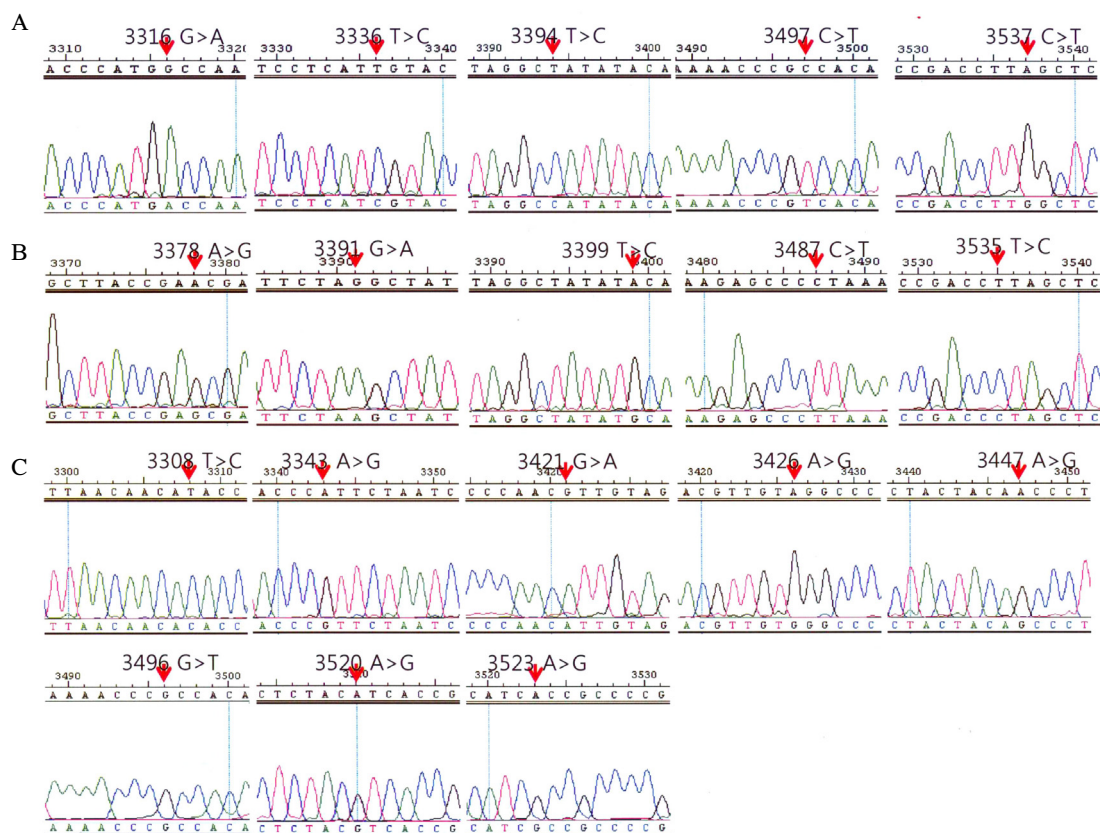


Fig. 2. Sequence results of PCR product amplified from target sequences contain SNPs on MT-ND1 gene. The arrows indicate the variant bases. A. SNPs were observed from both T2DM and normal subjects. B. SNPs were observed from only T2DM subjects. C. SNPs were observed from only normal subjects. SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

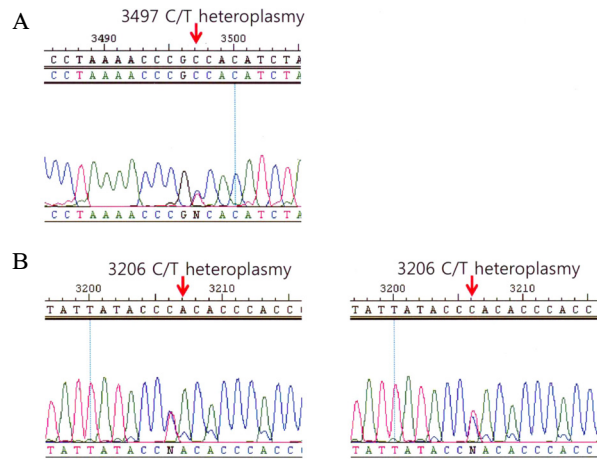


Fig. 3. Heteroplasmy observed from 3 individuals. The arrows indicate the variant bases, shown heteroplasmy. A. Heteroplasmy on MT-ND1 gene was observed from one T2DM patient. B. Heteroplasmy on MT-RNR2 gene was observed from two normal individuals. T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Table 4. Distributions of genotypes for the 7 SNPs identified from the Korean T2DM and normal control subjects

Gene	Locus		Genotype (Frequency)		OR	95% CI	P-value
			Major	Minor			
MT-RNR2	3010 (G/A)	T2DM	0.687	0.313	0.85	0.51~1.39	0.511
		Normal	0.722	0.278			
	3206 (C/T)	T2DM	0.925	0.075	0.60	0.22~1.58	0.300
		Normal	0.954	0.046			
MT-ND1	3316 (G/A)	T2DM	0.979	0.021	0.32	0.03~3.09	0.323
		Normal	0.993	0.007			
	3336 (T/C)	T2DM	0.979	0.021	0.32	0.03~3.09	0.323
		Normal	0.993	0.007			
	3394 (T/C)	T2DM	0.966	0.034	1.58	0.50~4.94	0.434
		Normal	0.947	0.053			
	3497 (C/T)	T2DM	0.979	0.021	1.97	0.48~8.04	0.343
		Normal	0.960	0.040			
	3537 (A/G)	T2DM	0.966	0.027	0.24	0.03~2.14	0.200
		Normal	0.993	0.007			

CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Table 5. Haplotype frequencies and evidence for T2DM association using 7 SNPs identified from the Korean T2DM and normal control subjects

No	Haplotype							Number (Frequency)		OR	95% CI	P-value
	3010	3206	3316	3336	3394	3497	3537	T2DM	Normal			
1	G	C	G	T	T	C	A	86 (0.589)	95 (0.629)	0.84	0.53~1.35	0.479
2	A	C	G	T	T	C	A	33 (0.226)	31 (0.205)	1.13	0.65~1.97	0.664
3	A	T	G	T	T	C	A	11 (0.075)	8 (0.053)	1.46	0.57~3.73	0.433
4	G	C	G	T	C	C	A	5 (0.034)	6 (0.040)	0.86	0.26~2.87	0.802
5	G	C	G	T	T	C	G	3 (0.021)	6 (0.040)	0.51	0.12~2.07	0.343
6	G	C	G	T	T	C	G	4 (0.027)	1 (0.007)	4.23	0.47~38.26	0.200
7	A	C	G	C	T	C	A	2 (0.014)	1 (0.007)	2.08	0.19~23.23	0.551

CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

하는 SNP의 수와 제2형 당뇨병과의 상관관계를 분석하고자 개체당 발생한 SNP의 수를 분석하였으며 발견된 24개의 SNP에 대한 분석 결과 한 개체가 동시에 가지고 있는 SNP의 최대수는 3개였으며 3개의 SNP가 동시에 발생한 검체는 제2형 당뇨병환자군에서 3명, 정상인에서 2명이었으며 동시에 2개의 SNP가 발생한 검체는 제2형 당뇨병환자군에서 12명, 정상인군에서 13명으로 큰 차이를 보이지 않았다(Table 4 and 5). 전체 발견된 24개의 SNP 중 두 집단 모두에서 발생하였던 7개의 SNP를 대상으로 같은 분석을 실시한 결과, 7개의 SNP 중 한 개체당 1개 이상의 SNP를 가진 경우는 당뇨병환자군에서 13명, 정상인에서 10명이었으며 2개 이상의 SNP를 동시에 갖는 경우는 당뇨병환자군에서 1명으로 정상인에서는 발견되지 않았다(Table 5). 7개의 SNP 부위에 대한 개체당 SNP 또한 개별 SNP 분석이나 일배체형 분석과 마찬가지로 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

고 찰

본 연구에서 분석된 mtDNA상의 3개 유전자에 대한 SNP와 그에 관련된 정보는 Chuang 등에 의해 만들어진 V-mitoSNP 사이트²¹⁾를 통하여 수집하였다. 지금까지 보고된 각 부위의 SNP수에 비해 본 연구에서 관찰된 SNP의 수는 현저히 적게 관찰되었으며 특히 MT-TL1의 경우 지금까지 22개의 SNP가 보고되었으나 본 연구결과에서는 어떠한 SNP도 발견할 수 없었다. 본 연구 결과 관찰된 SNP 중 가장 높은 빈도를 보이는 SNP는 3010 (G/A)였으며 당뇨병환자군에서 0.313, 정상인에서 0.278의 빈도로 관찰되었다. 3010 (G/A) SNP는 mtDNA의 haplogroup 분석 시 아시아에서 많이 관찰되는 D4 group을 결정하는 SNP로 한국인에서 미토콘드리아 DNA의 D4 group이 약 30%에 가깝게 분포한다는 것을 유추할 수 있다. 3010 (G/A)을 제외하면 3206 (C/T) (당뇨병환자군: 0.075, 정상인: 0.046), 3394 (T/C) (당뇨병환자군: 0.075, 정상인: 0.046), 3497 (C/T) (당뇨병환자군: 0.021, 정상인: 0.040), 3537 (A/G) (당뇨병환자군: 0.027, 정상인: 0.007), 3316 (G/A) (당뇨병환자군: 0.021, 정상인: 0.007)순으로 SNP의 빈도가 높게 나타났으며 나머지 SNP의 경우 1 또는 2 개체에서만 발견되는 매우 드문 SNP였다.

본 연구에서 분석된 3개의 유전자인 MT-RDR2와 MT-TL1, MT-ND1 중 SNP가 발견된 유전자는 MT-RDR2와 MT-ND1 총 2개의 유전자였으며 그 중 MT-ND1에서의 SNP

발생률이 더 높았다. MT-ND1은 NADH dehydrogenase subunit 1을 구성하는 유전자로 이 단백질의 경우 미토콘드리아 respiratory chain complex I을 구성하는 중요한 요소이며 이 단백질의 돌연변이는 산화적 인산화를 감소시키고 ATP 생산을 감소시키는 반면 활성화산소의 생산을 증가시키는 것으로 보고되었다. MT-ND1에서 발견된 SNP 중 3316 (G/A) SNP는 아미노산인 알라닌(Alanine)을 트레오닌(Threonine)으로, 3394 (T/C) SNP는 티로신(Tyrosine)을 히스티딘(Histidine)로 치환시켜 단백질의 2차 구조를 변화시킨다고 보고되어 있다²²⁻²⁴⁾. 최근 중국인에서 보고된 제2형 당뇨병과 관련된 많은 미토콘드리아 DNA SNP 결과를 보면 3316 (G/A)은 제2형 당뇨병과 연관성이 관찰되지 않았으며 3394 (T/C)의 경우는 중국인 제2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있다고 보고한 바 있다^{11,22,23)}. 또 다른 중국인에서의 제2형 당뇨병관련 mtDNA의 SNP 분석 결과는 mtDNA의 3316 (G/A), 3394 (T/C), 3426 (A/G) SNP가 모두 제2형 당뇨병과 밀접하게 관련되어 있다고 보고하였다²⁴⁾. 본 연구 결과, 한국인에서는 두 SNP 중 3316의 경우 당뇨병환자군에서 3명, 정상인군에서 1명으로 당뇨병환자군이 더 높게 관찰되었지만 3394의 경우 당뇨병환자군에서 5명, 정상인군에서 8명으로 정상인에서 더 높은 빈도로 관찰되었다. 그러나 두 SNP 모두 제2형 당뇨병과 통계적인 연관성을 찾을 수 없었다. 3243(A/G) SNP의 경우 제2형 당뇨병과의 관련성이 보고된 이후 중국인을 비롯한 일본인과 백인들에서도 제2형 당뇨병과의 관련성이 널리 알려졌는데 본 연구결과에서는 한국인 당뇨병환자군과 정상인 모두에서 전혀 발견할 수 없었다²⁵⁻³²⁾. 기존에 보고된 한국인의 연구결과를 살펴보면 503명의 당뇨병환자 중 단 1명에서 MT-TL1 유전자의 3243 SNP가 보고되었으나 한국인 당뇨병환자군 내에서 mtDNA의 이런 드문 SNP의 발생률은 다른 민족집단과는 달리 한국인의 경우 mtDNA의 SNP가 제2형 당뇨병과 연관성이 없음을 시사한다고 보고한 바 있다³³⁾. 또한 1998년 총 433명의 당뇨병환자군 내에서 2명의 3243 SNP와 3명의 3426 SNP를 갖는 환자가 보고된 바 있으나 해당 논문의 경우 정상인 집단에서의 SNP 발생률과의 비교가 이루어지지 않아 제2형 당뇨병과의 연관성을 언급하기 어려운 한계가 있다. 한국인 당뇨병환자군 내에서 보고된 mtDNA SNP의 이러한 낮은 빈도는 다른 민족들과 달리 한국인에서의 mtDNA의 SNP가 제2형 당뇨병과 연관되어 있지 않을 가능성을 뒷받침 한다. 개별 SNP에 대한 분석 외에도 개체당 mtDNA의 SNP 발생률과 제2형 당뇨병과의 연관성에 대한 연구들이 이루어 졌는데 2008년 중국인에서 보고된 연구에

따르면 MT-ND1과 MT-TL1 부위에서 1개나 2개 이상의 SNP를 가질 확률은 당뇨병환자군에서 4.7%, 정상군에서는 0.7%로 두 집단 간에 큰 차이를 보였으며 따라서 mtDNA의 SNP가 중국인의 제2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있음을 보고한 바 있다³⁴⁾. 일본의 경우 당뇨병환자 537명과 정상인 612명을 대상으로 MT-TL1과 MT-ND1 유전자의 SNP를 분석하였는데 총 8개의 SNP를 발견하였으며[3243, 3316, 3394, 3714, 3593, 3639, 3391, 3537] 정상인 집단에서 이들 8개 SNP 중 1개 이상을 갖는 개체가 29 (4.7%), 당뇨병환자군 집단에서 이들 8개 SNP 중 1개 이상을 갖는 개체수가 45 (8.4%)로 이들 유전자에서의 SNP 발생이 제2형 당뇨병과 매우 밀접하게 관련되어 있음이 보고되었다($P < 0.05$)³⁵⁾. 그러나 본 연구 결과에서의 MT-ND1과 MT-TL1의 SNP 발생률은 당뇨병환자군과 정상인군에서 통계적으로 큰 차이를 보이지 않는 것으로 관찰되었다. 다만 본 연구에서 실시한 chi-square 검정에 대한 통계적 검증력은 효과 크기를 0.2, 유의수준을 0.05, 자유도를 1로 하여 보았을 때 68%의 검증력을 보여 80% 이상의 검증력을 만족하지 못하였으며 분석된 연구대상들의 성별에 따른 차이가 고려되지 않아 향후 보다 많은 연구대상을 통한 추가적인 분석이 요구된다. 그럼에도 불구하고 본 연구 결과는 한국인에서의 향후 mtDNA SNP와 제2형 당뇨병의 연관성 분석의 기초 자료로서 유용하게 작용할 것으로 생각된다.

결론적으로 한국인 제2형 당뇨병에서 mtDNA의 MT-RNR2와 MT-TL1, MT-ND1 부위의 SNP 분석결과 한국인 제2형 당뇨병환자군에서는 정상인군과 뚜렷이 구분되는 mtDNA의 SNP를 발견하기 어려웠으며 유럽이나 아시아의 중국과 일본에서 보고된 제2형 당뇨병 관련 SNP도 한국인의 제2형 당뇨병과는 큰 연관이 없는 것으로 관찰되었다. 각 SNP의 일배체형이나 개체당 SNP 발생률 비교를 통한 분석결과도 제2형 당뇨병환자군과 정상인군을 구별할 수 있는 점을 발견하기 어려웠다. 이러한 결과로 미루어 보아 본 연구에서 분석된 부위의 SNP는 다른 민족들에서의 결과와 다르게 한국인의 제2형 당뇨병과 큰 연관이 없는 것으로 보인다.

요 약

연구배경: 최근 많은 연구그룹들에 의해 제2형 당뇨병과 연관되어 있는 다양한 미토콘드리아 DNA의 SNP들이 보고되었으나 보고된 SNP의 제2형 당뇨병과의 관련성은 분석 집단이나 연구그룹에 따라 이견을 보이고 있다. 따라서 본

연구에서는 한국인에서의 미토콘드리아 DNA의 다형성과 제2형 당뇨병과의 연관관계를 분석하고 지금까지 보고되어 있는 다른 민족 집단에서의 결과와 비교해보고자 하였다.

방법: 제2형 당뇨병환자군 147명과 정상인군 151명 총 298명의 말초혈액에서 DNA를 추출한 후 PCR 증폭을 통한 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석은 DNASTAR program의 SeqMan software를 이용하였으며 발견된 SNP는 NCBI 사이트와 V-mitoSNP site를 이용하여 기존에 보고된 SNP 결과와 비교하였다.

결과: 한국인 제2형 당뇨병에서 미토콘드리아 DNA의 MT-RNR2와 MT-TL1, MT-ND1 부위의 SNP 분석결과 한국인 제2형 당뇨병환자군에서는 정상인군으로부터 24개의 SNP를 발견하였다. 그러나 유럽이나 아시아에서 보고된 결과들과 다르게 한국인에서 발견된 mtDNA의 SNP는 제2형 당뇨병의 발병과 큰 연관이 없는 것으로 관찰되었다. 또한 각 SNP의 일배체형이나 개체당 SNP 발생률 비교를 통한 분석결과도 제2형 당뇨병환자군과 정상인군을 구별할 수 있는 점을 발견하기 어려웠다.

결론: 연구결과 발견된 24개의 SNP는 다른 민족들에서의 결과와 다르게 한국인의 제2형 당뇨병과 큰 연관이 없는 것으로 관찰되었으며, 이러한 결과는 미토콘드리아 DNA의 SNP가 분석 대상이 되는 민족에 따라 제2형 당뇨병의 발병에 미치는 영향이 달라진다는 것을 암시한다.

참 고 문 헌

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: *Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature* 290:457-65, 1981
2. Maechler P, Wollheim CB: *Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. Nature* 414:807-12, 2001
3. Suzuki Y, Iizuka T, Kobayashi T, Nishikawa T, Atsumi Y, Kadowaki T, Oka Y, Kadowaki H, Taniyama M, Hosokawa K, Asahina T, Matsuoka K: *Diabetes mellitus associated with the 3243 mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation: insulin secretion and sensitivity. Metabolism* 46:1019-23, 1997
4. Alcolado JC, Laji K, Gill-Randall R: *Maternal transmission of diabetes. Diabet Med* 19:89-98, 2002

5. Maassen JA: *Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis.* *Am J Med Genet* 115:66-70, 2002
6. Alcolado JC, Alcolado R: *Importance of maternal history of non-insulin dependent diabetic patients.* *BMJ* 302: 1178-80, 1991
7. Thomas F, Balkau B, Vauzelle-Kervroedan F, Papoz L: *Maternal effect and familial aggregation in NIDDM. The CODIAB Study. CODIAB-INSERM-ZENECA Study Group.* *Diabetes* 43:63-7, 1994
8. Moses R, Rodda M, Griffiths R: *Predominance of a maternal history of diabetes for patients with non -insulin-dependent diabetes mellitus. Implications for the intrauterine transmission of diabetes.* *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 37:279-81, 1997
9. Sheu WH, Song YM, Lee WJ, Yao YE, Lin CJ, Tseng LN, Bau CT, Bai CL: *Family aggregation and maternal inheritance of Chinese type 2 diabetes mellitus in Taiwan.* *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 62:146-51, 1999
10. Park KS, Chan JC, Chuang LM, Suzuki S, Araki E, Nanjo K, Ji L, Ng M, Nishi M, Furuta H, Shirotani T, Ahn BY, Chung SS, Min HK, Lee SW, Kim JH, Cho YM, Lee HK; Study Group of Molecular Diabetology in Asia: *A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians.* *Diabetologia* 51:602-8, 2008
11. Liao WQ, Pang Y, Yu CA, Wen JY, Zhang YG, Li XH: *Novel mutations of mitochondrial DNA associated with type 2 diabetes in Chinese Han population.* *Tohoku J Exp Med* 215:377-84, 2008
12. Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Nozawa Y, Lee HK, Tanaka M: *Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians.* *Am J Hum Genet* 80:407-15, 2007
13. Wang D, Taniyama M, Suzuki Y, Katagiri T, Ban Y: *Association of the mitochondrial DNA 5178A/C polymorphism with maternal inheritance and onset of type 2 diabetes in Japanese patients.* *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:361-4, 2001
14. Hegele RA, Zinman B, Hanley AJ, Harris S, Connelly PW: *A common mtDNA polymorphism associated with variation in plasma triglyceride concentration.* *Am J Hum Genet* 60:1552-5, 1997
15. Rai E, Sharma S, Koul A, Bhat AK, Bhanwer AJ, Bamezai RN: *Interaction between the UCP2-866G/A, mtDNA 10398G/A and PGC1alpha p.Thr394Thr and p.Gly482Ser polymorphisms in type 2 diabetes susceptibility in North Indian population.* *Hum Genet* 122:535-40, 2007
16. Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ: *Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study.* *Hum Mol Genet* 11:1581-3, 2002
17. Bhat A, Koul A, Sharma S, Rai E, Bukhari SI, Dhar MK, Bamezai RN: *The possible role of 10398A and 16189C mtDNA variants in providing susceptibility to T2DM in two North Indian populations: a replicative study.* *Hum Genet* 120:821-6, 2007
18. Chinnery PF, Elliott HR, Patel S, Lambert C, Keers SM, Durham SE, McCarthy MI, Hitman GA, Hattersley AT, Walker M: *Role of the mitochondrial DNA 16184-16193 poly-C tract in type 2 diabetes.* *Lancet* 366:1650-1, 2005
19. Feder J, Blech I, Ovadia O, Amar S, Wainstein J, Raz I, Dadon S, Arking DE, Glaser B, Mishmar D: *Differences in mtDNA haplogroup distribution among 3 Jewish populations alter susceptibility to T2DM complications.* *BMC Genomics* 9:198, 2008
20. *Visualization of human mitochondrial SNP (V-mitoSNP).* Available from: <http://bio.kuas.edu.tw/v-mitosnp/>
21. Chuang LY, Yang CH, Cheng YH, Gu DL, Chang PL, Tsui KH, Chang HW: *V-MitoSNP: visualization of human mitochondrial SNPs.* *BMC Bioinformatics* 7:379, 2006
22. Liu SM, Zhou X, Zheng F, Li X, Liu F, Zhang HM, Xie Y: *Novel mutations found in mitochondrial diabetes in Chinese Han population.* *Diabetes Res Clin Pract* 76:425-35, 2007
23. Tang DL, Zhou X, Li X, Zhao L, Liu F: *Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population.* *Diabetes*

- Res Clin Pract* 73:77-82, 2006
24. Yu P, Yu DM, Liu DM, Wang K, Tang XZ: *Relationship between mutations of mitochondrial DNA ND1 gene and type 2 diabetes. Chin Med J (Engl)* 117:985-9, 2004
 25. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA: *Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. Nat Genet* 1:368-71, 1992
 26. Smith PR, Dronsfield MJ, Mijovic CH, Hattersley AT, Yeung VT, Cockram C, Chan JC, Barnett AH, Bain SC: *The mitochondrial tRNA[Leu(UUR)] A to G 3243 mutation is associated with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes in a Chinese population. Diabet Med* 14:1026-31, 1997
 27. Ng MC, Yeung VT, Chow CC, Li JK, Smith PR, Mijovic CH, Critchley JA, Barnett AH, Cockram CS, Chan JC: *Mitochondrial DNA A3243G mutation in patients with early- or late-onset type 2 diabetes mellitus in Hong Kong Chinese. Clin Endocrinol (Oxf)* 52:557-64, 2000
 28. Vionnet N, Passa P, Froguel P: *Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus. Lancet* 342:1429-30, 1993
 29. Alcolado JC, Majid A, Brockington M, Sweeney MG, Morgan R, Rees A, Harding AE, Barnett AH: *Mitochondrial gene defects in patients with NIDDM. Diabetologia* 37:372-6, 1994
 30. Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, Tanabe Y, Sakura H, Awata T, Goto Y: *A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. N Engl J Med* 330:962-8, 1994
 31. Odawara M, Asano M, Yamashita K: *Mitochondrial gene mutations that affect the binding of the termination factor and their prevalence among Japanese diabetes mellitus. Nucleic Acids Symp Ser* 34:237-8, 1995
 32. Xiang K, Wang Y, Wu S, Lu H, Zheng T, Sun D, Weng Q, Jia W, Shen W, Pu L, He J: *Mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene mutation diabetes mellitus in Chinese. Chin Med J (Engl)* 110:372-8, 1997
 33. Lee YH, Kang ES, Kim SH, Han SJ, Kim CH, Kim HJ, Ahn CW, Cha BS, Nam M, Nam CM, Lee HC: *Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population. J Hum Genet* 53:991-8, 2008
 34. Li MZ, Yu DM, Yu P, Liu DM, Wang K, Tang XZ: *Mitochondrial gene mutations and type 2 diabetes in Chinese families. Chin Med J (Engl)* 121:682-6, 2008
 35. Fukuda M, Nakano S, Imaizumi N, Kitazawa M, Nishizawa M, Kigoshi T, Uchida K: *Mitochondrial DNA mutations are associated with both decreased insulin secretion and advanced microvascular complications in Japanese diabetic subjects. J Diabetes Complications* 13:277-83, 1999