

한국인 Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) 유전자의 다형성

Ryosuke Takahashi¹, 김 수 일, 이 영 호

¹일본 RIKEN 뇌과학연구소 운동계 신경변성연구실,
충남대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : Ciliary neurotrophic factor (CNTF)는 신경세포의 생명유지에 중요한 인자이며 사람들에게 있어 CNTF 유전자 돌연변이가 일본인에서 최초로 발견되었다. 본 연구자들은 한국인의 CNTF 유전자 돌연변이를 분석하여 일본인 또는 다른 국가나 인종의 CNTF 유전자의 돌연변이 빈도와 비교 연구하고자 하였다. 조사된 총 187명의 건강한 한국인 중 정상 동형접합체는 138명 (73.8%), 돌연변이 이형접합체 47명 (25.1%), 돌연변이 동형접합체 2명 (1.1%)이었다. 한국인의 CNTF 돌연변이 대립형질 빈도는 13.6%이었으며, 다른 국가와 인종의 CNTF 유전자 돌연변이 대립형질 빈도(10~20%)와 유의한 차이가 없었다.

찾아보기 낱말 : CNTF, 돌연변이, 한국인, 다형성

서 론

Ciliary neurotrophic factor (CNTF)는 병아리 모양 체신경절(ciliary ganglion)의 신경세포에서 동정되었으며, 이들 신경세포들의 생명유지에 중요한 인자(Adler 등 1979, Barbin 등 1984, Arakawa 등 1990)로 알려져 있다. CNTF는 주로 말초신경계에서 수초를 생산하는 Schwann세포와 시각신경(Lillien 등 1988, Dobrea 등 1992, Rende 등 1992) 등에서 풍부하게 생산되고, 중추신경계의 별아교세포 및 다른 유형의 신경아교세포에서도 면역조직화학 염색상 인지할 수 있는 양의 단백질이 생산된다(Dobrea 등 1992). CNTF는 시험관내에서 부교감신경세포, 교감신경세포, 척수 운동신경 및 해마 신경원세포의 강력한 생명유지 인자로서 작용하며(Sendtner 등 1990, Ip 등 1991, Oppenheim 등 1991, Hagg 등

1992, Sendtner 등 1992) 교감신경계의 콜린성 분화(Saadat 등 1989) 및 조직 배양된 O-2A 원시세포들이 제2형 별아교세포로 분화되는 것을 유도하기도 한다(Hughes 등 1988). 최근 들어 생쥐에서 CNTF 유전자를 제거하여 발육시킨 결과 운동신경의 변성이 초래되었음(Masu 등 1993)을 볼 때 CNTF가 운동신경의 생명유지에 중요한 인자임을 말해준다. 또한, 사람의 경우 CNTF에 돌연변이가 exon 시작하기 전의 -6 위치 intron 부위에서 발견되었고, 알츠하이머병, 근위축성측상경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(Takahashi 등 1994) 및 정신질환(Thome 등 1996a, b, Tanaka 등 1998) 등의 신경관련 질환과 CNTF의 돌연변이와의 연관성에 관한 연구가 진행되고 있다.

CNTF 유전자의 돌연변이를 최초로 확인한 Takahashi 연구팀은 정상 일본인에 있어 CNTF 유전자의 돌연변이 대립형질(allele) 빈도가 19.9% 정도 나타남을 확인하였다(Takahashi 등 1994). 이에 본 연구자들은 한국인의 CNTF 돌연변이 대립형질 빈도를 확인하고 다른 국가 또는 인종의 CNTF 돌연

*이 논문은 2001년도 충남대학교 자체연구비 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자: 이영호(충남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: yhlee@cnu.ac.kr

변이 대립형질의 빈도를 비교 조사 연구하고자 본 연구를 시행하였다.

연구 및 방법

1. 연구 대상

충남대학교 의과대학 재학중인 의학과 및 간호학과 학생과 충남대학교 의과대학 교직원으로 신체적으로 건강하다고 판단되는 사람들 중 연구 목적과 방법을 설명하고 자발적으로 참여하는 사람을 대상으로 하였으며, 참여한 모든 연구 대상자로부터 동의서를 받았다. 연구대상은 총 187명으로 남자가 142명 (76%), 여자가 45명 (24%)이었으며 평균연령은 23.5 ± 4.2 세이었다.

2. 연구 방법

1) DNA 추출

연구대상자의 위팔정맥에서 3ml의 혈액을 채취하여 50mM EDTA로 처리된 시험관에 넣어 DNA를 추출할 때까지 영하 20°C에서 보관하였다. 얼은 혈액을 녹인 후 같은 양의 phosphate buffer solution (PBS)을 첨가하고 잘 혼합한 다음 10분 동안 3000 RPM으로 원심분리한 후 상층액을 버리는 과정을 3회 반복 시행하여 적혈구를 제거한 다음 남은 침전물에 proteinase K buffer (10 mM Tris-HCL, pH 7.5, 20 mM NaCl, 25 mM EDTA) 1.35 ml를 넣고 잘 혼합하였다. 10% SDS 0.15 ml를 더하여 혼탁해질 때까지 잘 섞은 다음 proteinase K buffer를 1.5 ml 첨가한 후 proteinase K 용액 (10 mg/ml)을 40 µl 첨가하여 37°C에서 밤새 반응시켰다. Phenol 3 ml를 첨가한 후 10분 동안 일정한 속도로 회전시켜 잘 섞은 후 10분 동안 3,000 RPM으로 원심분리하였다. 10 ml의 새 시험관으로 수성층 (aqueous layer)을 옮겨서 phenol/CIA용액 (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) 3 ml를 첨가한 후 일정 속도로 회전을 시켜 잘 섞은 다음 10분 동안 3,000 RPM에서 원심분리하였다. 이후 15 ml의 또 다른 시험관으로 수성층을 옮겼다. 2배 용량의 100% ethanol을 첨가한 후 여러 번 잘 섞었다. 뭉쳐진 섬유형태의 DNA를

1 ml의 피펫 끝으로 잡아서 1.5 ml Ependorf tube에 넣어 4°C에서 5분 동안 15,000 RPM으로 원심분리하고 상층액을 버렸다. 차거운 70% ethanol 500 µl를 첨가한 후 5분 동안 15,000 RPM으로 원심분리한 후 상층액을 버리고 침사를 건조시켰다. 건조시킨 DNA 침사를 500 µl의 증류수에 넣고 55°C에서 밤새 반응시켜 DNA를 용해시킨 다음 spectrophotometer로 DNA의 양을 측정하였다.

2) 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

본 연구를 위해 사용한 시발체 (primer)는 Takahashi 등 (1994)이 사용한 시발체를 변형하여 사용하였는데 그 염기 배열순서는 다음과 같다.

Forward : 5'-ATCCTTGCCAGTGAGATGA-3'

Reverse : 5'-GATGTTCTTGTTTCATGCCCTG-3'

Reverse primer 중 밑줄 친 T는 절단효소 *HaeIII*의 절단부위 (GG/CC)를 없애기 위하여 인위적으로 시발체 염기를 G에서 T로 바꾸었다. 중합효소 연쇄반응은 0.5 µg/µl 농도의 DNA 3 µl, 10x PCR buffer 5 µl, 2.5 mM 4dNTP 4 µl, forward primer (50 pmole/µl) 1 µl, reverse primer (50 pmole/µl) 1 µl, 증류수 35.75 µl, Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.25 µl를 넣어 총 반응액의 부피가 50 µl 되게하여 잘 혼합하였다. 반응이 일어나는 동안 반응 혼합액이 증발되지 않도록 반응 혼합액의 표면을 완전히 덮을 정도로 mineral oil을 한방울 첨가하였다. Thermocycler (Biometra)를 이용하여 94°C에서 5분간 1주기를 시행한 후 94°C에서 1분, 66°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 35주기를 반복 수행하였고, 마지막으로 72°C에 5분 놓아둔 후 15°C에서 반응을 정지시켰다.

3) 제한효소법 및 전기영동

중합효소 연쇄반응에서 얻어진 반응액에 CIA 100 µl를 첨가해서 잘 혼합한 뒤 CIA를 추출하기 위하여 1분 동안 원심분리 한 후 중합효소 연쇄반응 추출물 30 µl를 얻어 3 M sodium acetate 5 µl와 100% ethanol이 60 µl를 첨가하여 잘 혼합하였다. 영하 20°C의 냉동실에 10분간 놓아둔 후 4°C에서 10분 동안 15,000 RPM으로 원심분리 하였다. 얻어진 침사를 4°C의 70% ethanol 100 µl로 수세 후 1

Table 1. Comparison of the CNTF mutation frequency among the nations or race

	Korean	Japanese (1) ^{a)}	Japanese (2) ^{b)}	German ^{c)}	Spanish ^{d)}	Caucasian ^{e)}
N/N	138	95	73	44	40	194
N/M	47	52	23	18	10	70
M/M	2	4	4	0	0	3
Mutated allele (M)frequency	0.136	0.199*	0.155	0.150	0.100*	0.142

N/N, normal homozygote; N/M, mutant heterozygote; M/M, mutant homozygote

*statistically different (p=0.041)

^{a)} Takahashi et al. (1994); ^{b)} Tanaka et al. (1998); ^{c)} Thome et al. (1996a); ^{d)} Thome et al. (1996a); ^{e)} Thome et al. (1996b).

분간 원심분리 후 진공건조기로 건조시켰다. 증류수 10.4 μl를 넣고 잘 섞은 후 10x 제한효소 buffer 1.5 μl와 제한효소 *Hae*III 1 μl를 처리한 후 2시간 동안 37°C의 배양기에 놓아두었다. Ethidium bromide 염색용액을 넣은 3% agarose gel에서 전기영동한 후 자외선 투사기로 관찰하고 카메라로 촬영하였다.

4) 통계적 분석방법

한국인 및 다른 국가 또는 인종간의 CNTF 유전자의 대립유전자 빈도에 대한 유의성 검증은 Chi-square test를 사용하였으며, 유의수준은 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 한국인의 CNTF 유전자의 대립유전자 빈도

101 bp 부위에 띠가 나타나면 정상 동형접합체 (normal homozygote, N/N), 135 bp 부위와 101 bp 부위에 띠가 나타나면 돌연변이 이형접합체 (mutant heterozygote, N/M), 135 bp 부위에만 띠가 나타나면 돌연변이 동형접합체 (mutant homozygote, M/M)로 판정하였다. 조사한 한국인의 유전자형은 N/N 138 (73.8%), N/M 47 (25.1%), M/M 2 (1.1%)이었고, CNTF 돌연변이 대립유전자 빈도는 N 323 (86.4%), M 49 (13.6%)이었다.

2. 한국인과 다른 국가 또는 인종의 CNTF

대립유전자 빈도의 비교

CNTF 유전자 돌연변이 대립형질 빈도가 한국인

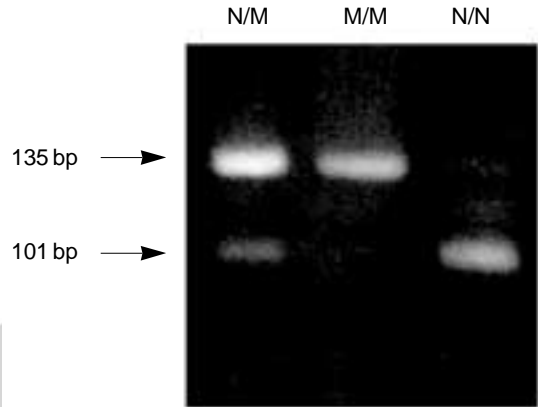


Fig. 1. PCR analysis of the mutation of CNTF gene in Korean.

N/M, mutant heterozygote; M/M, mutant homozygote; N/N, normal homozygote.

은 0.136, 일본인은 0.199 또는 0.155, 독일인은 0.15, 스페인인은 0.10 및 코카시안 인종은 0.142이었으며 (Table 1), 일본인과 스페인인 사이에 CNTF 돌연변이 대립유전자 빈도는 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 (p=0.041) 다른 그룹간에는 유의한 차이가 없었다.

고 찰

한국인은 CNTF 유전자 돌연변이 대립형질 빈도는 0.136이었으며, 다른 국가나 민족의 경우 CNTF 유전자 돌연변이 대립형질 빈도가 0.10에서 0.20 사이로 나타났다.

CNTF 유전자를 제거한 생쥐는 생후 28주가 되어 운동신경에 손상이 나타났다 (Masu 등 1993). 이

는 CNTF가 운동신경의 정상적인 성장이나 유지에 중요한 역할을 할 것임을 보여준다. 사람의 경우에도 CNTF 유전자의 돌연변이가 만성신경질환 또는 정신질환과 관련성이 있다는 연구보고도 있지만 대체적으로 신경관련 질환과 연관성이 없는 연구 결과(Takahashi 등 1994, Thome 등 1996a, b, Tanaka 등 1998, Giess 등 2002)들이 주를 이루고 있다. 본 연구에서 2명이 돌연변이 동형접합체 유전자를 가지고 있었으며 정상 일본인의 경우에도 수명의 돌연변이 동형접합체 유전자를 가지고 있었다. 그러나, 이들 모두 특별한 신경관련 질환이나 증상을 보이지 않았다. 사람에게 있어 신경세포에 중요한 역할을 하는 CNTF가 없어도 특별한 문제가 발생하지 않는 이유는 다른 신경영양인자(neurotrophic factor)가 보상작용에 기인한 것으로 여겨진다. 특히, leukemic inhibitory factor (LIF)는 CNTF와 구조와 기능이 유사하여(Haas 등 1999, He 등 2002, Marz 등 2002), LIF가 CNTF의 결여를 보상하여 신경계가 기능적으로 정상적인 가능성이 있다. Hardy-Weinberg 평형식(Schaid와 Jacobsen 1999, Rogatko 등 2002)에 의하면 돌연변이 동형접합체 유전자가 본 연구의 연구대상(187명) 중 발생할 수가 3.5명 정도 된다. 이는 돌연변이 동형접합체가 나타날 수 있는 기대치와 실제 본 연구에서 나타난 돌연변이 동형접합체(2명)에 유의한 차이가 없다는 것을 나타내 주며, 돌연변이 동형접합체 유전자를 가진 사람이 태어나 죽지 않고 살아남았음을 시사해 준다. 그러나, 정상적인 상태에서는 LIF 등 다른 신경영양인자들이 보상작용으로 신경계 이상을 초래하지 않지만, 신경계가 병적인 상태 즉 신경손상이나 만성퇴행성 신경질환 등이 발생하면 정상적인 CNTF 유전자를 가진 사람보다는 신경에 이상이 나타날 가능성은 배제할 수 없다.

CNTF의 유전자 다형성은 영 돌연변이(null mutation) 즉 단백질 형성이 잘 되지 않는 치명적인 돌연변이지만 돌연변이 대립유전자가 사람의 10%에서 20% 정도 존재하며 특별한 신경계 이상이 없음을 볼 때 중성 돌연변이(neutral mutation) 즉 변이(variation)에 가깝다고 생각된다(Bowcock 등 1991). 전형적인 중성 변이에 속하는 ABO 혈액

형은 국가간 민족간 혈액형의 비율이 매우 다르다. 예를 들어 영국인은 B형 대립형질 유전자를 가진 사람의 비율이 8%이며 북부 스칸디나비아인은 4.8%이지만, 한국인은 B형 대립형질 유전자를 가진 사람의 비율이 21% 정도 된다(Kang 등 1997). CNTF 돌연변이 대립유전자가 나타나는 비율은 ABO 혈액형의 변이와는 달리 국가나 인종간에 10~20%로 비교적 일정하다. 이러한 CNTF 유전자 다형성이 인류진화의 역사에 있어 인류의 기원과 관련되어 있을 가능성은 있지만 인류의 진화에서 의미하는 것을 규명하려면 추가적인 연구가 필요하다.

앞으로, 근위축성 측삭경화증, 알츠하이머병 및 기타 신경질환자들의 CNTF 유전자 다형성을 조사하고 이에 따른 질환의 발병 빈도 및 예후에 대한 연구가 필요하다. 또한, 계통발생학적으로 사람과 가장 가까운, 침팬지, 고릴라 및 오랑우탄 등의 원숭이과에서 CNTF의 다형성의 유무와, 아직까지 CNTF 유전자 다형성에 관한 연구가 안된 여러 국가 또는 민족의 사람들을 대상으로 CNTF 유전자 다형성을 밝혀보는 작업도 필요하다고 본다.

참고 문헌

- Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S : Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204 : 1434-1436, 1979.
- Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H : Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 10 : 3507-3515, 1990.
- Barbin G, Manthorpe M, Varon S : Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. *J Neurochem* 43 : 1468-1478, 1984.
- Bowcock AM, Kidd JR, Mountain JL, Hebert JM, Carotenuto L, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL : Drift, admixture, and selection in human evolution: a study with DNA polymorphisms. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 88 : 839-843, 1991.
- Dobrea GM, Unnerstall JR, Rao MS : The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central and

- peripheral nervous system of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 66 : 209–219, 1992.
- Giess R, Maurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, Rieckmann P : Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59 : 407–409, 2002.
- Haas CA, Hofmann HD, Kirsch M : Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. *J Neurobiol* 41 : 559–571, 1999.
- Hagg T, Quon D, Higaki J, Varon S : Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron* 8 : 145–158, 1992.
- He W, Gong K, Zhu G, Smith DK, Ip NY : Membrane distal cytokine binding domain of LIFR interacts with soluble CNTFR in vitro. *FEBS Lett* 514 : 214–218, 2002.
- Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M : Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335 : 70–73, 1988.
- Ip NY, Li YP, van de Stadt I, Panayotatos N, Alderson RF, Lindsay RM : Ciliary neurotrophic factor enhances neuronal survival in embryonic rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 11 : 3124–3134, 1991.
- Kang SH, Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Han KS, Nishimukai H, Okubo Y : Distribution of ABO genotypes and allele frequencies in a Korean population. *Jpn J Hum Genet* 42 : 331–335, 1997.
- Lillien LE, Sendtner M, Rohrer H, Hughes SM, Raff MC : Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. *Neuron* 1 : 485–494, 1988.
- Marz P, Ozbek S, Fischer M, Voltz N, Otten U, Rose-John S : Differential response of neuronal cells to a fusion protein of ciliary neurotrophic factor/soluble CNTF-receptor and leukemia inhibitory factor. *Eur J Biochem* 269 : 3023–3031, 2002.
- Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H : Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365 : 27–32, 1993.
- Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J : Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251 : 1616–1618, 1991.
- Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M : Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 5 : 25–32, 1992.
- Rogatko A, Slifker MJ, Babb JS : Hardy-Weinberg equilibrium diagnostics. *Theor Popul Biol* 62 : 251–257, 2002.
- Saadat S, Sendtner M, Rohrer H : Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 108 : 1807–1816, 1989.
- Schaid DJ, Jacobsen SJ : Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol* 149 : 706–711, 1999.
- Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA : Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360 : 757–759, 1992.
- Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H : Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345 : 440–441, 1990.
- Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T : A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7 : 79–84, 1994.
- Tanaka Y, Ujike H, Fujiwara Y, Takeda T, Takehisa Y, Kodama M, Otsuki S, Kuroda S : Schizophrenic psychoses and the CNTF null mutation. *Neuroreport* 9 : 981–983, 1998.
- Thome J, Durany N, Harsanyi A, Foley P, Palomo A, Kornhuber J, Weijers HG, Baumer A, Rosler M, Cruz-Sanchez FF, Beckmann H, Riederer P : A null mutation allele in the CNTF gene and schizophrenic psychoses. *Neuroreport* 7 : 1413–1416, 1996a.
- Thome J, Kornhuber J, Baumer A, Rosler M, Beckmann H, Riederer P : Association between a null mutation in the human ciliary neurotrophic factor (CNTF) gene and increased incidence of psychiatric diseases?. *Neurosci Lett* 203 : 109–110, 1996b.

Abstract

Polymorphism of the Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Gene in Korean

Ryosuke Takahashi¹, Soo-Il Kim, Young-Ho Lee

¹*Laboratory for Motor System Neurodegeneration, RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan
Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea*

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is one of the important factors in neuronal survival. Mutation in CNTF gene was found first in Japanese. We analyzed the CNTF genotype of 187 healthy volunteer of Korean, and compared the frequency difference in CNTF gene mutation among Korean, Japanese, and other nations or race. The number of normal homozygote was 138 (73.8%), mutant homozygote 47 (25.1%), and mutant homozygote was 2 (1.1%). The mutated allele frequency of CNTF gene in Korean was 13.6%, which was not significantly different from that of other nations or race (10~20%).

Key words : CNTF, Mutation, Korean, Polymorphism