

OCT2 수송체 근위 프로모터 부위의 새로운 유전자 변이 발굴

이화여자대학교 의과대학 약리학교실
최 지 하

= Abstract =

Identification of Novel Genetic Variations in the Proximal Promoter of the Human Transporter, OCT2

Ji Ha Choi

Department of Pharmacology, School of Medicine, Ewha Womans University

Objectives : Human organic cation transporter 2, OCT2(SLC22A2), highly expressed on the renal proximal tubular cells, plays an important role in the renal excretion of endogenous and exogenous organic cations including many therapeutic drugs. This study was performed to identify genetic variations in the proximal promoter region of *OCT2*.

Methods : The promoter region of *OCT2* was amplified and directly sequenced from genomic DNA samples from individuals of diverse ethnicities(n=272). The promoter activity of *OCT2* was measured using a luciferase reporter assay in two cell lines ; ACHN, and HCT-116.

Results : There were four polymorphic(minor allele frequency >1% in at least one of the four ethnic groups) variants in the *OCT2* promoter region(-250/+60 from the transcription start site). One(V2, g.-246C>T) of them showed decreased reporter activity by 38%($p<0.001$), whereas another one(V4, g.-47C>T) showed increased activity by 10%($p<0.05$), compared to the reference in HCT-116 cell line.

Conclusion : This study revealed that novel promoter variants of *OCT2* results in changes in transcriptional activity of this gene. These variants can potentially affect the pharmacokinetics or drug response of many drugs that are substrates of *OCT2*.

KEY WORDS : *OCT2* · Genetic variation · Promoter · Transporter.

서 론

신장은 간장과 더불어 약물의 체외 배출에 중요한 역

교신저자 : 최지하, 158-710 서울 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의과대학 약리학교실
전화 : (02) 2650-5746 · 전송 : (02) 2653-8891
E-mail : Jihachoi@ewha.ac.kr

할을 하는 기관으로 양이온을 띠는 약물들은 신장에서 여과 및 능동 수송의 과정을 거쳐서 제거된다¹⁾. 능동 수송이 일어나기 위해서는 약물의 혈액에서 신장 세뇨관 쪽으로의 이동이 필요한데, 이 때의 약물 이동은 농도 및 전기화학적 경사에 반하는 것이므로 수송체의 도움이 필요하다. 유기 양이온 수송체(organic cation transporter, OCT) 중의 하나인 *OCT2*는 주로 신장의 근위

세노관에 발현되어 있으면서 이와 같은 약물의 능동 수송, 궁극적으로는 약물의 신장을 통한 배설에 중요한 역할을 한다^{2,3)}. 선행 연구에 따르면 metformin, amantadine, cimetidine, quinine 등의 다양한 약물들이 *OCT2*의 기질(substrate)로, 이 수송체의 도움을 받아 체내에서 제거되는 것으로 알려졌다²⁾.

같은 약물을 동일한 용량으로 투여하는 경우 대부분의 사람들에서는 비슷한 치료 효과를 얻을 수 있지만 일부 사람들에서는 효과가 나타나지 않거나 심각한 부작용이 나타난다. 예를 들어 미국의 경우 입원 환자의 약 5%에서 약물 부작용이 나타나며 연간 10만 명 이상의 사람들이 이로 인해 사망한다⁴⁾. 이와 같이 약물에 대한 반응이 개체 간에 다르게 나타나는 이유로는 환자의 나이, 몸무게, 성별, 영양 상태 등의 환경적인 요인과 더불어 유전적인 요인을 고려할 수 있겠다. 최근 인간 게놈에 대한 광범위한 염기서열 분석 진행으로 많은 약물 수송체의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이 밝혀지고 있다. SNP는 수송체의 발현, 기질 친화도 등에 영향을 줄 수 있고 이로 인해 수송체의 기능은 wild type과 비교했을 때 감소하거나 증가할 수 있다⁵⁾. *OCT2*는 신장에서 약물을 운반하는 역할을 하므로 이 수송체의 기능 변동은 약물의 약동학에 변화를 일으킬 수 있고, 치료 효과, 부작용 등에도 의미 있는 영향을 줄 수 있다. 또한 *OCT2*는 체내 신경전달물질 운반에 관여하므로 항상성 유지에도 중요한 역할을 할 것이다⁶⁾.

*OCT2*의 유전자 변이에 대한 연구는 최근에 활발히 이루어져 현재까지 약 40여 개의 유전자 변이가 밝혀졌다⁷⁾. 이 중 coding 부위에서는 16개의 유전자 변이가 발견되었는데 8개의 유전자 변이가 아미노산의 변화를 초래하는 것이었다⁸⁾. 이러한 nonsynonymous 변이 중에서도 *OCT2*의 기능에 미치는 영향에 대하여 가장 많은 연구가 진행된 유전자 변이는 *OCT2* p.A270S이다. Chen Y 등⁸⁾에 의한 연구에 따르면 270S 변이 유전자의 경우 *in vitro* 실험에서 *OCT2*의 수송능을 증가시키며, 건강한 사람들을 대상으로 한 임상시험에서도 270S 변이 유전자가 있는 개체군(아프리카인 또는 유럽인)의 경우 *OCT2*의 기질 중 하나인 metformin의 신장 내 제거율이 증가한다는 것이 밝혀졌다. 반면 Song IS 등⁹⁾¹⁰⁾은 이와는 반대로 270S 변이 유전자는 *in vitro* 상에서 *OCT2*의 수송능을 감소시키며, 한국인을 대상으로 한

임상시험을 통하여 이 변이 유전자를 가진 군에서 metformin의 신장 제거율이 감소한다고 보고하였다. 같은 변이 유전자라도 어떤 변이 유전자와 일배체형(haplotype)을 구성하고 있느냐에 따라 궁극적으로 유전자의 기능에 다른 영향을 초래할 수 있기 때문에 위와 같이 인종에 따라 임상시험 결과가 상반되게 나오는 것은 가능한 일이다. 하지만 동일한 조건에서 시행된 *in vitro* 결과가 상반된 것에 대한 이유는 아직까지 밝혀지지 않고 있다.

Coding 부위에 대한 유전자 변이에 대한 연구는 비교적 활발하게 진행되고 있는 반면, *OCT2* 프로모터 부위의 유전자 변이에 대해서는 아직까지 연구된 바가 거의 없다. Ogasawara K 등¹¹⁾은 일본인을 대상으로 *OCT2* 프로모터 유전자 변이를 검색한 결과 -578_-576deLAAG 변이를 찾았고 *in vitro* 실험 결과 이 변이 유전자가 *OCT2*의 프로모터 활성을 감소시킨다는 것을 밝혔다.

본 연구에서는 다양한 인종(아프리카, 유럽, 아시아, 멕시코)에서 *OCT2* 프로모터 부위의 새로운 유전자 변이를 찾고 변이 유전자가 *OCT2*의 프로모터 활성에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 유전자 분석

272명의 혈연 관계가 없는 건강한 사람들로부터(4군의 인종 : 아프리카인, 유럽인, 아시아인, 멕시코인, 각각 68명) 얻은 게놈 DNA를 autonomic sequencer 방법을 이용하여 *OCT2* 근위 프로모터 부위(-250부터 +60까지의 염기 쌍, 전사 시작점 기준)의 유전자 변이를 분석하였다. 각 유전자 변이 위치 번호는 *OCT2* mRNA(GenBank accession number ; NM_003058) 서열을 기준으로 전이 시작점으로부터 나타냈으며, Antonarakis SE 등¹²⁾이 제안한 유전자 변이 명명법을 따랐다.

2. *OCT2* 프로모터 부위의 변이 유전자 벡터 제작

OCT2 프로모터를 포함하는 리포터 플라스미드(reporter plasmid)를 제작하기 위하여 게놈 DNA를 주형으로 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 시행하여 437 염기 쌍의 *OCT2* 유전자를 증폭하였다. 여기서 얻은 생성물을 NheI, HindIII효소로 자른 후 pGL4.11b [*luc2*] 벡터(Invitrogen)에 삽입하였다. 변이 유전자를 포함하는 클론은 wild type 클론을 주형으로 site-directed muta-

genesis kit(Stratagene)을 이용한 중합효소 연쇄 반응을 통하여 얻었다. 본 연구에서 제작한 모든 클론은 직접적인 시퀀싱 방법을 통하여 DNA 서열을 재확인하였으며, 각 중합효소 연쇄 반응에 사용된 프라이머 목록은 Table 1에 명시하였다.

3. Luciferase 활성 측정

Luciferase reporter 유전자 활성은 Dual luciferase reporter assay system(Promega Corporation)을 이용하여 측정하였다. 이 때 세포는 10% 우태아 혈청, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) medium 1640에서 37°C, 5% CO₂ 하에 배양한 ACHN(human kidney adenocarcinoma) 세포 또는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에서 37°C, 5% CO₂하에 배양한 HCT-116(human colon carcinoma) 세포를 이용하였다. Luciferase 활성은 각 세포에 wild type, 변이 클론을 Lipofectamine LTX 및 Plus reagent(Invitrogen)를 이용하여 각각 transfection시킨 후 30시간 후에 Glo-max 96-well plate luminometer(Promega)를 이용하여 측정하였다.

4. 통계 분석

Luciferase 활성 측정 결과는 3번의 반복 실험 결과

로부터 얻어진 평균±표준편차로 나타내었다. 이 때 각 값은 공 벡터인 pGL4.11b [*luc2*]의 luciferase 활성 정도를 1로 보았을 때 reference(wild type, *OCT2*-PGL4.11b) 혹은 변이 클론의 활성 정도를 상대적으로 나타내었다. 통계 분석은 Dunnett's multiple comparison test을 이용하였으며, *p*값이 0.05보다 작은 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. *OCT2* 프로모터 부위의 유전자 변이

4군의 인종으로 구성된 272개의 DNA 샘플로부터 총 4개의 유전자 변이가 *OCT2* 근위 프로모터 부위에서 발견되었고, 모든 유전자 변이는 다형성(polymorphism; 적어도 한 인종에서 마이너 대립유전자 빈도가 1% 이상인 경우)을 나타내었다(Table 2). 이 중 *g.*-246C>T 유전자 변이가 가장 높은 빈도를 보였으며 특히 아프리카인에서 그 빈도(5.6%)가 높게 나타났다.

2. *OCT2* 변이 유전자가 *OCT2* 프로모터 활성에 미치는 영향

본 연구에서 찾은 *OCT2* 프로모터 부위의 변이 유전자의 기능을 dual luciferase reporter assay system

Table 1. Oligonucleotide primers used in the construction of *OCT2* reporter plasmids

Primers for <i>OCT2</i> promoter cloning*	
Sense (NheI site)	5'- CTA GCT AGC GTG TTT TCT CCA TAG GGC CTT GA-3'
Antisense (HindIII site)	5'- CCC AAG CTT GAG GCT GCC CGA CGT G-3'
Primers for site-directed mutagenesis PCR**	
<i>g.</i> 424G>A	5'-CTT GAA AAG CTG GCA GTG CGC ATG AGA TAG GA-3'
<i>g.</i> -246C>T	5'-GAG AAC CAG TTA TAA TAA ACA TGA CAG GCA TCC TGG GAG-3'
<i>g.</i> -195A>G	5'-AGT GCA GAA GGA CGT GCA AAA CCG CTG-3'
<i>g.</i> -47C>T	5'-GCC GCT CTC AGC CTT GCT CCG GG-3'

*: The restriction endonuclease sites are marked by bold-faced letters

** : The SNP (single nucleotide polymorphism) sites are marked by bold-faced letters

Table 2. Allele frequencies of *OCT2* variants in the proximal promoter

Identification	Variant	Allele frequency			
		African american	European american	Chinese american	Mexican american
V1	<i>g.</i> -424G>A	0.040	0.007	0.000	0.008
V2	<i>g.</i> -246C>T	0.056	0.007	0.000	0.000
V3	<i>g.</i> -195A>G	0.016	0.000	0.000	0.000
V4	<i>g.</i> -47C>T	0.000	0.000	0.017	0.000

Data were obtained from a DNA samples from 272 unrelated individuals including 68 from each of four major ethnic groups

Position of the variant is based upon the translational start site

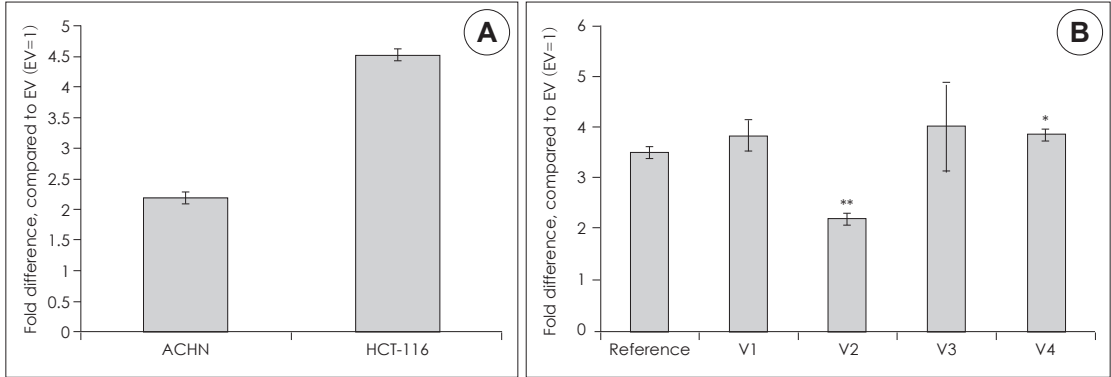


Fig. 1. Luciferase activities in cell lines expressing reporter constructs containing each genetic variant of the basal promoter of OCT2. Luciferase activities were measured 30 hours after transfection of the reporter plasmids into ACHN (A) or HCT-116 (A, B) cell lines. The reporter activity of each construct was compared with that of empty vector (pGL4.11b [*luc2*]). Data shown represent mean \pm SD from triplicate wells in a representative experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the reference.

을 이용하여 측정하였다. Wild type 클론을 두 종류 (ACHN, HCT-116)의 세포에 transfection 시킨 후 luciferase 활성을 측정했을 때 ACHN 세포에서보다 HCT-116 세포를 이용했을 때가 2.0배 정도의 높은 활성을 보였다(a, Fig. 1). 따라서 변이 클론에 대한 luciferase 활성 측정은 HCT-116 세포를 이용하여 시행하였다. 그 결과 본 연구에서 가장 높은 빈도를 보인 g.-246C>T 변이 유전자의 경우 reference와 비교했을 때 luciferase 활성이 38% 정도 감소되었고($p=0.0001$), 또 다른 변이 유전자 g.-47C>T는 10% 증가된($p=0.0137$) luciferase 활성을 나타내었다(b, Fig. 1).

고 찰

OCT2는 신장 세뇨관 세포의 기저측면에 많이 발현되어 있으면서 다양한 약물들의 수송에 관여한다²³⁾. 따라서 coding 혹은 non-coding 부위의 유전자 변이에 의한 OCT2의 기능 혹은 발현 변화는 이 수송체 기질 약물의 농도 변화를 초래하게 될 것이다.

본 연구는 OCT2 근위 프로모터 부위에서의 새로운 유전자 변이를 찾고 각 변이 유전자의 기능 변화를 알아보기 위하여 시행되었다. 다양한 인종군의 DNA 검색을 통하여 총 4개의 유전자 변이를 발굴하였다. 그러나 최근 Ogasawara K 등¹¹⁾이 일본인을 대상으로 찾은 OCT2 프로모터 유전자 변이인 -578_-576delAAG은 본 연구에서는 발견되지 않았다. 이는 본 연구에서 사

용된 아시아인 DNA는 중국인으로 구성된 것으로, 유전자 변이 빈도는 같은 아시아인이더라도 중국인과 일본인 간에 차이가 있을 수 있음을 말해준다.

본 연구에서 가장 높은 빈도를 나타낸 변이인 g.-246C>T는 reporter assay 결과 유의하게 감소된 프로모터 활성을 보였다. TFSearch 3.1(Real-World Company Partnership) 소프트웨어를 이용한 전사 인자 결합 부위(transcription factor binding site, TFBS) 분석 결과 g.-246C>T 부위에 XFD-2라는 전사 인자가 결합하며 유전자 변이 유무에 따라 결합 정도가 다를 것으로 예측되었다. XFD(Xenopus fork head domain related)-2는 Xenopus laevis embryo에서 처음 발견되었으며 HNF(hepatocyte nuclear factor)-3와 아미노산 서열 및 DNA 결합 부위가 유사한 것으로 알려졌다¹³⁾¹⁴⁾. 그러나 아직까지 이 전사 인자의 기능에 대해서는 연구된 바가 없다. Wild type과 비교했을 때 유의하게 높은 프로모터 활성을 보인 g.-47C>T 변이 유전자의 경우 TFBS 분석 결과 유전자 변이 유무에 따라 결합 정도가 달라지는 전사 인자가 없었다. 이와 같은 소프트웨어를 통한 전사 인자 예측을 검증하기 위해서는 젤 지연 분석법(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)과 같은 추가적인 분자생물학적 실험이 뒷받침되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 새롭게 발견된 OCT2 프로모터 부위의 유전자 변이 g.-246C>T, g.-47C>T가 OCT2 유전자의 전사 조절에 관여한다는 것을 밝혔다.

이와 같은 역할을 하는 변이 유전자는 궁극적으로 OCT2 기질 약물들의 약동학 혹은 약력학에 영향을 줄 수 있을 것이다.

요 약

목 적

유기 양이온 수송체 2(OCT2, SLC22A2)는 신장의 근위 세뇨관 세포에 많이 발현되어 있으면서 내인성 또는 외인성(약물 포함) 물질들의 신장 내 제거에 중요한 역할을 한다. 본 연구는 OCT2의 근위 프로모터 부위의 유전자 변이를 찾기 위하여 시행되었다.

방 법

다양한 인종으로 구성된 272명의 게놈 DNA을 이용한 직접적인 시퀀싱 방법을 통해 OCT2 프로모터 부위의 유전자 변이를 검색하였다. 프로모터 활성은 ACHN, HCT-116 세포를 이용한 dual luciferase assay 기법을 통하여 측정하였다.

결 과

OCT2 근위 프로모터 부위에서 총 4개의 유전자 변이를 발견하였으며 모든 유전자 변이는 다형성(적어도 한 인종군에서 마이너 대립유전자 빈도>1%)을 나타냈다. 프로모터 활성을 측정한 결과 g. -246C>T 변이는 유의하게 감소된 활성(38%, $p < 0.001$)을 보였고, 또 다른 변이인 g. -47C>T는 유의하게 증가된 활성(10%, $p < 0.05$)을 나타냈다.

결 론

본 연구는 OCT2 유전자의 전사를 조절하는 새로운 유전자 변이를 밝혀냈다. 이러한 유전자 변이는 궁극적으로 OCT2의 기질인 많은 약물들의 약동학 혹은 약물 반응에 영향을 끼칠 수 있을 것이다.

중심 단어 : OCT2 · 유전자 변이 · 프로모터 · 수송체.

References

- 1) Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y : *Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. Eur J Pharm Sci* 2006 ; 27 : 425-446
- 2) Fujita T, Urban TJ, Leabman MK, Fujita K, Giacomini

KM : *Transport of drug in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variations. J Pharm Sci* 2006 ; 95 : 25-36

- 3) Burckhardt G, Wolff NA : *Structure of renal organic anion and cation transporters. Am J Physiol Renal Physiol* 2000 ; 278 : 853-866
- 4) Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans EW : *Pharmacogenomics and individualized drug therapy. Annu Rev Med* 2005 ; 57 : 119-137
- 5) Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF : *Pharmacogenetics. 2nd ed. Drugs and the pharmaceutical sciences, Taylor & Francis, 2005 : 109-155*
- 6) Lee WK, Wolff NA, Thévenod F : *Organic cation transporters : physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate. Curr Drug Metab* 2009 ; 10 : 617-631
- 7) Leabman MK, Huang CC, Stryke D, Johns SJ, Kawamoto M, Ferrin TE, et al : *PharmGKB update : I. Genetic variants of the organic cation transporter 2 (OCT2, SLC22A2). Pharmacol Rev* 2003 ; 55 : 399
- 8) Chen Y, Li S, Brown C, Cheatham S, Castro RA, Leabman MK, et al : *Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin. Pharmacogenet Genomics* 2009 ; 19 : 497-504
- 9) Song IS, Shin HJ, Shim EJ, Jung IS, Kim WY, Shon JH, et al : *Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. Clin Pharmacol Ther* 2008 ; 84 : 559-562
- 10) Song IS, Shin HJ, Shin JG : *Genetic variants of organic cation transporter 2 (OCT2) significantly reduce metformin uptake in oocytes. Xenobiotica* 2008 ; 38 : 1252-1262
- 11) Ogasawara K, Terada T, Motohashi H, Asaka J, Aoki M, Katsura T, et al : *Analysis of regulatory polymorphisms in organic ion transporter genes (SLC22A) in the kidney. J Hum Genet* 2008 ; 53 : 607-614.
- 12) Antonarakis SE and The Nomenclature Working Group : *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Hum Mut* 1998 ; 11 : 1-3
- 13) Lef J, Clement JH, Oschwald R, Köster M, Knöchel W : *Spatial and temporal transcription patterns of the forkhead related XFD-2/XFD2' genes in Xenopus laevis embryos. Mech Dev* 1994 ; 45 : 117-126
- 14) Kaufmann E, Müller D, Knöchel W : *DNA recognition site analysis of Xenopus winged helix proteins. J Mol Biol* 1995 ; 248 : 239-254