

사람의 게놈에 존재하는 Cytochrome P450 2E1의 Retropseudogene에 대한 분자유전학적 증거

계명대학교 자연과학대학 생물학과

유 민^{*} · 신송우

국문초록: Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)의 retropseudogene이 사람에 존재하는 지 확인하기 위해 혈액에서 분리한 DNA를 주형으로 한 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. Primer는 CYP2E1 유전자를 기초하여 여러개 제작하되 적절한 조합에 따라 정상유전자와 retropseudogene이 동시에 증폭될 수 있도록 고안하였다. 본 실험의 결과 그동안 예상은 되었지만 DNA 차원에서 미처 확인되지 못하였던 CYP2E1의 retropseudogene을 직접 증폭해낼 수 있었다. 세부 구조는 Southern blotting과 DNA 염기서열 결정에서 최종 분석되었다. PCR 반응으로 증폭된 부분에서는 염기서열이 mRNA와 완전히 일치하고 있는 점으로 미루어서 CYP2E1의 retropseudogene은 비교적 최근에 발생했을 것으로 추정되었다.

서 론

Cytochrome P450 (P450)는 450 nm에서 흡광스펙트럼을 나타내는 효소들의 총칭이다. 이들은 내, 외인성 화합물의 대사는 물론 스테로이드 대사와 지방산의 불포화에 이르기까지 다양한 반응들을 촉진시킨다¹⁰. P450 효소들이 대부분 해독작용에 관여하는데 비해 cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)과 같은 일부 P450는 기질을 오히려 생활성시킴으로써 각종 질환의 원인이 되는 것으로 잘 알려져 있다^{4,5,8}. 특별히 CYP2E1이 알코올에 의해 유도되는 것은 흥미로운 사실이다¹¹. 동물실험을 통한 보고에 의하면 CYP2E1은 알코올성 간질환의 직접적인 원인이 될 뿐만 아니라 각종 암과 알콜성 뇌질환에도 중요한 원인으로 작용할 것으로 추정되고 있다¹³. 최근에 fetal alcohol syndrome의 원인으로서 CYP2E1을 확인한 Juchau 등의 보고는 이 점을 뒷받침하는 좋은 증거이다¹. CYP2E1의 mRNA는 이미 쥐, 생쥐, 사

람, 토끼의 간에서 잘 분리되어 있으며^{3,6,14} 유전자 역시 사람과 쥐의 게놈에서 구조 분석이 이루어져 있다^{15,16}.

Pseudogene은 유전자가 진화하는 과정에서 형성된 것으로 기능을 상실한 유전정보를 일컫는 용어이다⁷. 이들은 유전암호의 읽는 체계를 변형시키는 다양한 돌연변이 때문에 유전적 기능을 상실한 것이 보통이며 게놈을 팽창시키는 역할외에는 아직 특별한 의미가 알려져 있지 않다. Pseudogene 중에서도 특별히 관심의 대상이 되는 것은 retropseudogene이라 부르는 구조이다. Retropseudogene은 intron이 제거된 cytoplasmic mRNA가 retroviral activity에 의해 역전사된 뒤 거꾸로 게놈 속으로 통합된 것으로서 대부분 기능이 없게 마련이다. 이미 몇몇 cytochrome 효소들 중에는 retropseudogene이 발견된 경우가 상당수 있고 cytochrome b₅ 같은 경우에는 여러 종류의 retropseudogene이 확인되기도 하였다¹⁷. 본 연구는 사람의 게놈을 분석하는 과정에서 발견된 CYP2E1의 retropseudogene을 최초로 확인한 보고이다. 본 연구의 결과는 CYP2E1으로 인한 알코올성 질환들을 DNA 차원에서 신속 정확하게 진단하고, 장차 치료법을 개발하기 위한 학문적 기초를 마련할 것으로 기대된다.

* 논문접수: 1998년 8월 21일
수정재접수: 1998년 11월 27일

[†] 별책요청 저자

재료 및 방법

재료. Genomic DNA 분리를 위한 혈액은 20대의 건강한 성인 남, 여로부터 각각 채취하였다. Human liver CYP2E1 cDNA probe는 Dr. Guengerich (Vanderbilt University, USA)로부터 분양받았다. DIG DNA labeling and Detection kit와 DNA sequencing kit는 Boehringer Mannheim (Germany)과 USB (USA)로부터 각각 구입하였다. Polymerase chain reaction (PCR)을 위한 primer는 (주)바이오니아 (대전, Korea)에 의뢰하여 제작, 정제하였다. 제한효소를 비롯한 각종 효소와 nylon membrane, 기타 화학시료들은 Promega (USA), Amersham (UK), Stratagene (USA) 등으로부터 구입하였다.

Genomic DNA의 분리. 혈액 10 ml을 hemolysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)와 잘 섞어 반응시킨 다음 10% SDS 용액과 proteinase K (10 mg/ml)를 처리하여 37℃에서 밤새 반응시켰다. Phenol과 chloroform으로 1회 가볍게 추출한 다음 1/10배의 3M NaAc (pH 5.2)와 2배의 ethanol을 첨가하였고 실처럼 분리되는 DNA 가닥을 U자형으로 구부린 유리막대로 건져내었다. DNA는 멸균수에 녹여 내었고 OD₂₆₀과 OD₂₈₀을 측정하여 농도와 순도를 각각 결정하였다.

Polymerase chain reaction (PCR). PCR 반응은 denaturation을 94℃에서 1분, annealing을 55℃에서 45초, extension을 72℃에서 1분씩 모두 35 cycle을 실행하였다. 필요에 따라서는 pre-denaturation과 post-extension 반응을 각각 94℃에서 1분, 그리고 72℃에서 5분간 실시하였다. PCR 반응의 양성대조군으로는 human liver CYP2E1 cDNA를, 음성대조군으로는 pBluescript KS plasmid를 사용하였다. 반응에는 주형으로 사용된 DNA 20~25 ng, 10X buffer (20 mM Tris-Cl, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin (pH 8.4)) 2 µl, dNTP 혼합물 500 µM, 각각의 primer 100pmole, Taq DNA polymerase 0.5 unit를 첨가하여 최종 20 µl로 혼합하였다.

PCR product의 클로닝. PCR 반응액 중 10 µl를 취해 1.2% agarose gel에서 증폭된 DNA의 크기를 확인하고, 남은 반응액 10 µl와 EcoRV 처리한 pBluescript KS vector 100 ng을 혼합하여 16℃에서 3시간 ligation 반응시켰다. 반응이 끝나면

electroporation으로 JM109에 형질전환시켰고, insert가 클로닝된 형질전환체들은 X-gal, IPTG, ampicillin이 각각 40 µg/ml, 5 mM, 그리고 100 µg/ml로 첨가된 배지에서 blue/white color selection으로 선별하였다.

Southern blot analysis. 전기영동한 DNA들은 0.5 N NaOH 용액을 반응 buffer로 사용하면서 Hybond N⁺ nylon membrane으로 이동시켰다. Hybridization probe로는 human liver CYP2E1 cDNA를 사용하였다. Hybridization 반응은 60℃에서 실시하였으며 Digoxigenin을 이용한 probe의 표지와 결과의 확인은 kit를 제조한 회사에서 제시한 대로 실시하였다.

DNA sequencing. 반응을 위한 DNA 주형은 alkaline lysis 방법으로 준비하였다⁹. 반응의 절차는 Sanger의 primer extension 방법에 준하되¹²) USB 회사 (USA)의 Sequenase Version 2.0 kit을 사용하여 실시하였다.

결 과

사람의 게놈에서 CYP2E1 retropseudogene을 확인하기 위한 실험적 전략은 Figure 1에 정리하였다. PCR primer의 제작에는 Song과 Umeno 등이 보고한 cDNA의 염기서열과 유전자의 exon/intron 구조를 참고하였다^{14,15}). 즉 sense와 antisense 양방향 primer를 각각 인접한 4개의 exon (exons 6-9)에 기초하여 제작하되 그 사이에 2831 bp, 499 bp, 884 bp의 intron들이 포함될 수 있는 부분을 선택하였다. 이렇게 제작한 3종류의 primer가 exon 6에 기초한 P1 (ACCACCAGCACAACCTCTGAGATATGG, sense)과 exon 7에 기초한 P2 (ATGCCCTACATGGATGCTGTGGTGCA, sense), 그리고 exon 9에 기초한 P3 (CAATTCATGCGGGCCAGGCCTTCTCC, antisense)였다.

이론상 만약 사람의 게놈에 CYP2E1 retropseudogene이 존재하지 않으면, 즉 정상유전자만 존재한다면, primer P1, P3의 조합에서는 P1부터 P3 끝까지의 exon sequence 435 bp (61+188+142+44)와 intron에 해당하는 4214 bp (2831+499+884)를 합한 약 4.6 kb DNA 절편이 증폭되어야 할 것이다. 반대로 만일 CYP2E1 retropseudogene이 함께 존재한다면 이 4.6 kb DNA는 물론이고, intron이 모두 제거된 구조인 435 bp의 DNA 절편이 함께 증폭되어야 할 것이다. 그러나 실제로는 Taq po-

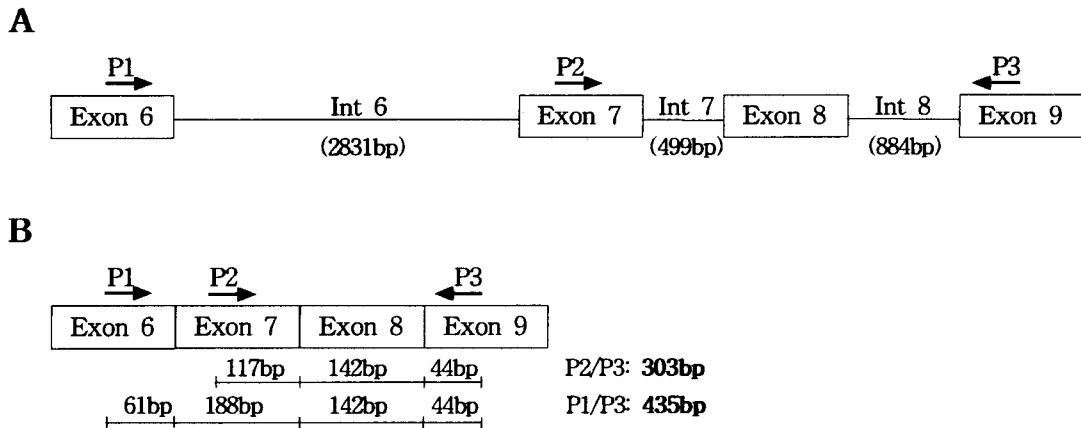


Figure 1. Strategy to amplify both functional CYP2E1 gene (A) and its retropseudogene (B) from human genomic DNA. Only part of the gene (from exon 6 to exon 9) is shown in this picture. PCR primers (P1, P2, P3) were designed based on exon 6, exon 7 and exon 9. Int means intron. The size of exons is exaggerated for the graphic purpose. There is no corresponding sequence to introns within the structure of retropseudogene.

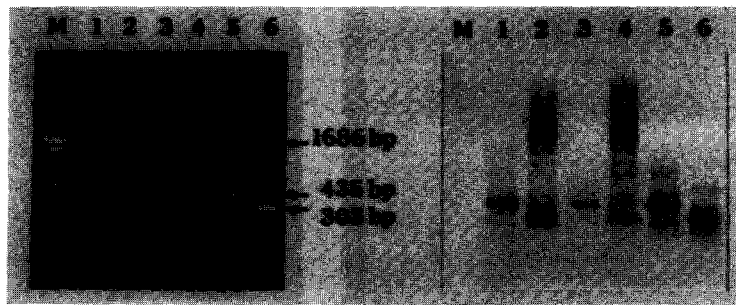


Figure 2. Results of electrophoresis (left panel) of PCR products and Southern blot analysis (right panel). PCR templates were human genomic DNA isolated from male (lanes 1, 2) and female (lanes 3, 4) or human liver CYP2E1 cDNA (lanes 5, 6). PCR primers were P1/P3 for lanes 1, 3, 5 and P2/P3 for lanes 2, 4, 6. Lane M represents the size marker, 100 bp ladder.

lymerase의 증폭 범위가 약 2 kb 내외인 것을 감안할 때 4.6 kb band가 증폭되기는 대단히 힘들 것이 예상되었다. 따라서 전기영동상 구별할 수 있는 결과는 정상유전자만 있는 경우라면 아무런 band가 확인되지 않을 것으로, retropseudogene이 함께 존재한다면 435 bp band가 확인될 것으로 추정되었다.

Figure 2에 정리된 것처럼 P1, P3의 조합으로 실시한 PCR에서 435 bp band만이 확인되었다 (left panel, lanes 1, 3). 이 크기는 앞에서 계산했던 것 처럼 CYP2E1 retropseudogene에 정확히 일치하는 것이었다. 그러나 사람의 게놈에는 정상유전자가 당연히 있어야 함에도 불구하고 4.6 kb band는 전혀 확인되지 않았다. 이는 예상했던대로

Taq polymerase의 증폭 범위를 벗어난 크기이기 때문인 것으로 추정되었다. 이 435 bp band들은 Southern blotting 결과에서도 human liver CYP2E1 cDNA probe에 강한 신호를 나타냈기에 (right panel, lanes 1, 3) CYP2E1에 특이적인 증폭이 이루어졌음을 재확인시켜 주었고, 결국 사람의 게놈에 CYP2E1 retropseudogene이 존재함을 강력히 시사하였다.

그러나 역시 가장 직접적인 증거는 한번의 PCR에서 정상유전자와 retropseudogene을 동시에 증폭하여 확인하는 것일 것이다. 상기실험에서는 정상유전자가 너무 커 증폭되지 못하였기에 이번에는 2831 bp의 intron이 포함되지 않는 P2와 P3의 조합으로 PCR 반응을 재실시하였다. 이 조합에

▼ Int. 6

accaccagcacaactctgagatatgggctcctgatttctcatgaaataccctgagatcgaagagaagctccatgaagaattgacagggtg

Primer P1

attggccaagcccgaatccctgccatcaaggataggcaagagatgcctacatggatgctgtggtgcatgagattcagcggttcatcacc

Primer P2

▼ Int. 7

ctcgtgccctccaacctgccccatgaagcaacccgagacaccattttcagaggatacctcatccccaaagggcacagtctgtagtgccaact

ctggactctgttttgatgacaaccaagaatttctgatccagaaaagtttaagccagaacacttctgaatgaaaatggaagtcaag

▼ Int. 8

tacagtgactatttcaagccattttccacaggaaaacgagtgtgtgctggagaaggcctggctcgcattggagtg

Primer P3

Figure 3. Nucleotide sequence of PCR product (435 bp) representing a CYP2E1 retropseudogene. The positions for Primers P1, P2, P3 are indicated as underlined. This retropseudogene does not contain any intronic sequences at all, however, the relative locations for introns are indicated with arrows when compared to a functional CYP2E1 gene. Int means intron.

서는 정상유전자가 exon sequence 303 bp (117+142+44)와 두 개의 작은 intron (499 bp, 884 bp)을 합한 1686 bp로 증폭될 것과, retropseudogene이 303 bp로 증폭될 것이 예상되었다 (Figure 1). 실험결과는 역시 Figure 2의 전기영동 사진에 정리하였다. 예상대로 1686 bp와 303 bp의 band가 동시에 확인되었으며 (lanes 2, 4). 이들을 다시 human liver CYP2E1 cDNA probe로 Southern blotting을 한 결과에서도 모두 강한 신호를 나타내었기에 CYP2E1에 특이적으로 증폭되었음을 재확인할 수 있었다 (right panel). 실험결과로부터 1686 bp band는 정상유전자에 해당하는 것으로, 그리고 303 bp band는 최초로 확인된 CYP2E1 retropseudogene에 해당하는 것으로 결론지었다. 더욱 세밀한 분석을 위하여 human liver CYP2E1 cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 대조군으로 실시하였다. Retropseudogene은 cytoplasmic mRNA가 역전사된 것이기에 cDNA와 구조가 동일할 것이기 때문이다. Primer P1과 P3, P2와 P3로 각각 실시한 PCR에서 435 bp, 303 bp의 DNA band가 각각 증폭되었고 (left panel, lanes 5, 6), Southern blotting에서도 강한 신호를 나타내었으며 (right panel), lane 1과 2의 retropseudogene에서 얻어진 결과와 비교한 결과 동일한 것으로 확인되었다.

직접적이고도 최종적인 확인을 위하여 primer P1과 P3의 조합으로 증폭된 retropseudogene의 PCR 산물 (435 bp)에 대하여 DNA sequencing을 수행하였다. 그 결과는 Figure 3에 정리하였는데

예상대로 intron에 해당하는 부분은 없었으며, 모든 염기서열이 human liver CYP2E1 mRNA와 정확히 일치하였다¹⁴⁾. 결론적으로 사람의 게놈에는 적어도 1종류의 CYP2E1 retropseudogene이 존재하며, 이는 intron이 제거된 형태로서 전체적으로 human liver CYP2E1 mRNA와 염기서열에서 동일하거나 매우 유사할 것으로 최종 결론지었다.

고 찰

Retropseudogene을 확인하기 위한 일반적인 방법은 genomic Southern blotting에서 확인된 DNA band들 중 정상유전자에 해당하지 않는 것들을 일일이 클로닝하여 분석하거나 genomic library에서 해당 DNA 절편을 분리하는 것이다⁷⁾. 그러나 이 방법은 시간이 많이 소요되고 또 과정이 복잡하다는 것이 단점이다. 특히 상당수의 retropseudogene이 전체 구조보다는 일부분만 게놈 속으로 통합되어 있어 그 확인이 더욱 어려운 실정이다.

본 연구에서는 보다 직접적이고도 신속한 확인을 위해 genomic DNA를 주형으로 사용한 PCR로 CYP2E1의 retropseudogene을 증폭하는 새로운 접근을 시도하였다. CYP2E1의 유전자 구조 중 exon 6에서 exon 9 사이에 해당하는 부분을 선택한 이유는 primer를 적절히 조합함에 따라 정상유전자와 retropseudogene을 동시에 증폭해내는 것이 용이하기 때문이었다. Primer P1, P3 그리고

P2, P3의 조합에서 공히 CYP2E1의 retropseudogene을 확인할 수 있었다. 세부 구조는 Southern blotting과 DNA sequencing에서 재확인되었고, 적어도 본 연구에서는 남성과 여성의 성별에 따른 차이도 없는 것으로 확인되었다. 증폭된 부분에서는 염기서열이 mRNA와 완전히 일치하고 있었기에 CYP2E1의 retropseudogene은 비교적 최근에 발생했을 것으로 추정되었다.

경우에 따라서는 retropseudogene이 완벽하게 유전암호의 전체적인 체계를 유지하면서 다른 유전자의 promoter 위치로 들어가 발현될 가능성도 배제할 수 없다. CYP2E1의 retropseudogene도 우리가 증폭한 부분에 한해서는 온전한 체계를 유지하고 있었기에 이런 가능성을 배제할 수 없을 것으로 일단 사료되었다. 본 연구에서는 그동안 예상은 되었지만 미처 확인되지 않았던 CYP2E1의 retropseudogene을 DNA 차원에서 직접 분리할 수 있었다. 과연 몇 종류의 CYP2E1 retropseudogene이 사람의 게놈에 존재할 것인지, 그리고 이들이 과연 발현될 수 있을 것인지 여부 등에 관한 연구는 앞으로도 계속 수행되어야 할 과제이다.

참 고 문 헌

- 1) Boutelet-Bochan H, Huang Y and Juchau MR (1997): Expression of CYP2E1 during embryogenesis and fetogenesis in human cephalic tissues: implications for the fetal alcohol syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, **238**: 443-447.
- 2) Cristiano RJ, Giordano SJ and Steggles AW (1993) The isolation and characterization of the bovine cytochrome b₅ gene, and a transcribed pseudogene. *Genomics*, **17**: 348-354.
- 3) Davis JF and Felder MR (1992): Mouse ethanol-inducible cytochrome P450 (P450 2E1). *J Biol Chem*, **268**: 16584-16589.
- 4) Gilliam EMJ, Guo Z and Guengerich FP (1994): Expression of modified human cytochrome P 450 2E1 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys*, **312**: 59-66.
- 5) Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Sugimura H, Trivers GE, Tucker MA, Trump BF, Weston A and Harris CC (1994): Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention*, **3**: 515-518.
- 6) Khani SC, Porter TD, Fujita VS and Coon MJ (1988): Organization and differential expression of two highly similar genes in the rabbit alcohol-inducible cytochrome P-450 subfamily. *J Biol Chem*, **263**: 7170-7175.
- 7) Kim DJ and Yoo M (1993): Isolation and Characterization of Retropseudogene for Human Cytochrome b₅. *Molecules and Cells*, **3**: 53-57.
- 8) Koop DR (1992): Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *The FASEB J*, **6**: 724-730.
- 9) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 10) Nelson DR, Kamataki T, Waxmann DJ, Guengerich P, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez F, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda k and Nebert DW (1993): The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biol*, **12**: 1-51.
- 11) Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS and Song BJ (1994): Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**: 1064-1071.
- 12) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463-5467.
- 13) Song BJ and Cederbaum AI (1996): Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance. *Alcohol: Clin Exp Res*, **20**: 138A-146A.
- 14) Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS and Gonzalez FJ (1986): Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. *J Biol Chem*, **261**: 16689-16697.

- 15) Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV and Gonzalez FJ (1988): Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping and cDNA-directed expression. *Biochemistry*, **27**: 9006-9013.
- 16) Umeno M, Song BJ, Kozak C, Gelboin HV and Gonzalez FJ (1988): The rat P450IIE1 gene: complete intron and exon sequence, chromosome mapping and correlation of developmental expression with specific 5' cytosine demethylation. *J Biol Chem*, **263**: 4956-4962.
- 17) Yoo M and Steggle AW (1989): The characterization of three types of partially processed mRNA and two pseudogenes for human liver cytochrome b₅. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**: 18-24.

=Abstract=

**Molecular Evidence for the Presence of CYP2E1 Retropseudogene
in Human Genome**

Min Yoo[†] and Song-Woo Shin

Department of Biology, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

We have carried out polymerase chain reaction (PCR) to investigate if retropseudogene for CYP2E1 is present in human genome. PCR primers were designed based on the structure of functional CYP2E1 gene and used to amplify both functional gene and retropseudogene in one reaction. From the repeated experiments we were able to amplify a previously unidentified CYP2E1 retropseudogene that was present in human genome. Its detailed structure was confirmed by Southern blotting and DNA sequencing. Nucleotide sequence of this retropseudogene was completely matched up to human liver CYP2E1 mRNA suggesting that the development of this retropseudogene might be a relatively recent event.

Key Words: CYP2E1, Retropseudogene

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(2): 129-135, December, 1998]

[†] Corresponding author