J. Biomed. Lab. Sci. 8 (2002) 185-188

Complete Nucleotide Sequence of KCNE1 in Korean Genome

Shin Il Yeo, Su Won Kim, Yoon Nyun Kim[1], Kwan Hee You[2], Song Woo Shin[3], Myoung Hee Kim[4], Jae Chan Song[5] and Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, [1]Department of Cardiology, Keimyung University Dongsan Medical Center, Taegu, 700-712, [2]Department of Biology, Chungnam University, Daejeon, 305-764, [3]Wooridul Spine Hospital, Seoul, 135-100, [4]Department of Anatomy, Yonsei University College of Medicine, Seoul, 120-752, [5]Department of Veterinary Science, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

We have cloned the gene for long QT syndrome in Korean genome and determined its detailed nucleotide sequence. Blood DNAs were isolated from 68 healthy individuals (including males and females) and the genomic DNAs were amplified by PCR method followed by automatic DNA sequencing. Entire sequence of the coding region for KCNE1 was located in exon 3. PCR products were reexamined for the confirmation of KCNE1-specific amplification by nested PCR. KCNE1 mRNA was 436 bp. This corresponded to 129 amino acids. There was no recognizable difference between males and females. This study should contribute to the better understanding of long QT syndrome in Korean population.

Key Words: Long QT syndrome, QT interval, KCNE1, Nested PCR

서 론

QT 연장증후군 (Long QT Syndrome)은 심장의 전기시스템 장애 때문에 발병하는 질환이다. 심박동을 유지하기 위해서는 재분극이 항상 일어나야 하는데 이것이 제대로 이루어지지 못하면 의식을 잃게 되고 심할 경우 돌연사 할 수도 있다[5,7]. QT 간격 (QT interval)이란 심장세포가 다음 박동을 준비하는데 걸리는 시간으로 이것이 비정상적으로 길어질 때를 QT 연장증후군이라 한다. QT 간격이 길어지면 심실성 빈맥이 나타나고 혈액을 심장에서 강하게 밀어내지 못함으로써 뇌로 가는 혈액이 모자라게 되는 것이다[1,3]. QT 연장증후군은 평소에 아무런 증상이 없다가도 운동이나 스트레스에 의해 발병하는 경우가 많으므로 정확한 진단과 치료를 위해 연구가 시급한 상황이다. 보고에 의하면 QT 연장증후군 환자 중 일부는 가족력을 나타낸다고 알려져 있다. 이는 이 질환에 유전적 소인이 강하게 작용하고 있음을 시사하는 것이다[2,4]. 심지어는 비록 후천적인 경우일지라도 유전자의 염기서열이 돌연변이된 경우가 많기 때문에 유전자 차원에서의 연구가 반드시 요구되는 질환이다.

*논 문 접 수: 2002년 9월 19일
수정재접수: 2002년 9월 27일
†별책 요청 저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 생물학과
Tel: 053-580-5537, Fax: 053-580-5537
e-mail: ymin@kmu.ac.kr

QT 연장증후군은 선진국형 질병으로 인식되어 왔는데 우리나라에서도 최근에 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 그동안 우리나라에 QT 연장증후군이 상대적으로 적었던 이유는 여러 가지가 있겠지만 가장 근본적인 것은 진단 방법의 개발이 서구보다 늦어졌기 때문이다. 특히 가족력을 보이는 경우 유전자 차원에서의 분석과 조사가 필수적이지만 우리나라에서는 이에 대한 인식과 연구가 늦어졌다는 것이다.

QT 연장증후군을 연구하는 데에 가장 큰 장애는 복합유전자에 의한 질환 (multigene defect)이라는 점이다[6,8]. 병인에는 최소 4개 이상의 유전자가 관여되어 있을 것으로 보고있는데 유전자별로 Type I (KVLQT1), Type II (HERG), Type III (SCN5A), Type V (KCNE1)로 분류하고 있다[4,6]. 미국에서 보고된 변이 (genetic variation)들을 살펴보면 환자마다 변이의 형태와 위치가 판이해서 특정한 한 가지에 초점을 맞추어 진단하기란 사실상 불가능한 현실이다. 지금도 전 세계에서 새로운 돌연변이와 SNP (single nucleotide polymorphism)들이 계속 보고되고 있는데 대부분의 연구가 미국을 중심으로 이루어지고 있고, 한국에서는 아직 환자가 몇 명이나 되는지 기초적인 통계 자료조차 제대로 확보되어 있지 못한 형편이다.

최근에 미국에서는 상기 유전자들을 정상인에서 분리해내었다[4,6]. 그리고 이들 유전자에 대한 정보를 임상 진단에 일부 적용하기도 하였다. 이와 비슷하게 한국인 게놈에서도 이 유전자들을 분리해 염기서열을 밝히는 것이 첫 번째 과제이다. 그럼으로써 앞으로 보다 많은 자료가 축적될 때 한국인의 QT 연장증후군에 대해 폭넓은 유전자 차원에서의 이해가

도모될 수 있을 것이며 맞춤 진단법을 개발할 수도 있을 것이기 때문이다. 본 연구에서는 Type V의 유전자인 KCNE1을 한국인의 게놈에서 온전하게 분리하고 염기서열을 결정한 결과를 보고하고자 한다.

Primer	Sequence		Relative Position
1F	CTGCAGCAGTGGAACCTTAA	(20 mer)	1~20
1R	TTTAGCCAGTGGTGGGGT	(18 mer)	419~436
2F	TCAGCAGGGTGGCAACATG	(19 mer)	91~109
2R	AGATGGTTTTCAACGACA	(19 mer)	348~366

Fig. 1. Primers to be used for the amplification of KCNE1.

재료 및 방법

1. 재 료

본 연구에 사용한 한국인 게놈 DNA는 임상적으로 정상이라 판명된 성인 남, 여 68명으로부터 동의서를 구하고 혈액을 채취해 분리하였다. PCR kit와 DNA cleaning kit는 인제사이언스 (Korea), Takara (Japan) 등으로부터 구입하였고 pGemT-easy vector는 Promega (USA)에서 구입하였다. PCR primer는 (주)바이오니아 (Korea)에 의뢰하여 제작하였고 DNA의 염기서열은 (주)마크로젠 (Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 실험에 사용한 모든 초자기구는 121℃에서 30분간 고압증기멸균하여 사용하였고, microcentrifuge tube와 일회용 tip, petridish 등은 일회용품을 사용하였다.

```
C T G C A G C A G T G G A A C C T T A A T G C C C A G G A T G A T C C T G T C T -  40
                  1 F                                   M   I   L   S     -   4
A A C A C C A C A G C G G T G A C G C C C T T T C T G A C C A A G C T G T G G C -  80
N   T   T   A   V   T   P   F   L   T   K   L   W   Q                       -  18
A G G A G A C A G T T C A G C A G G G T G G C A A C A T G T C G G G C C T G G C - 120
                      2 F
    E   T   V   Q   Q   G   G   N   M   S   G   L   A                       -  31
C C G C A G G T C C C C C C G C A G C G G T G A C G G C A A G C T G G A G G C C - 160
  R   R   S   P   R   S   G   D   G   K   L   E   A                       -  44
C T C T A C G T C C T C A T G G T A C T G G G A T T C T T C G G C T T C T T C A - 200
L   Y   V   L   M   V   L   G   F   F   G   F   F   T                       -  58
C C C T G G G C A T C A T G C T G A G C T A C A T C C G C T C C A A G A A G C T - 240
    L   G   I   M   L   S   Y   I   R   S   K   K   L                       -  71
G G A G C A C T C G A A C G A C C C A T T C A A C G T C T A C A T C G A G T C C - 280
  E   H   S   N   D   P   F   N   V   Y   I   E   S                       -  84
G A T G C C T G G C A A G A G A A G G A C A A G G C C T A T G T C C A G G G C C C - 320
D   A   W   Q   E   K   D   K   A   Y   V   Q   A   R                     -  98
G G G T C C T G G A G A G C T A C A G G T C G T G C T A T G T C G T T G A A A A - 360
                                                      2 R
    V   L   E   S   Y   R   S   C   Y   V   V   E   N                       - 111
C C A T C T G G C C A T A G A A C A A C C C A A C A C A C A C C T T C C T G A G - 400
  H   L   A   I   E   Q   P   N   T   H   L   P   E                       - 124
A C G A A G C C T T C C C C A T G A A C C C C A C C A C T G G C T A A         - 436
T   K   P   S   P                   1 R                                   - 129
```

Fig. 2. Nucleotide Sequence and the corresponding amino acid sequence of KCNE1. Relative positions of primers are underlined. Initiation codon (ATG) and termination codon (TGA) are boxed.

2. 방 법

혈액은 매 실험당 200 μl 씩 채혈하였고 이로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 요약하면 혈액 200 μl를 hemolysis buffer (155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 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 2회 가볍게 추출한 다음 1/10배의 3 M NaAc (pH 5.2)와 2배의 ethanol을 첨가하여 실처럼 분리되는 DNA 가닥을 U자형으로 구부린 유리막대로 건져내었다. 건져낸 DNA는 멸균수에 녹인 다음 UV spectrophotometer를 사용하여 농도를 측정하였고 사용할 때까지 4℃에 보관하였다. DNA의 농도는 1.0% agarose gel을 사용해 전기영동한 후 DNA band의 선명도를 육안으로 관찰해 결정하였다.

혈액에서 분리한 게놈 DNA를 주형으로 하고, KCNE1의 exon 3을 증폭해낼 수 있는 primer를 이용해 PCR 반응하였다. Primer의 종류와 염기서열, 그리고 상대적 위치는 Fig. 1에 요약하였다. 반응액의 조성은 template DNA 10 μl (25~50 ng), 10X PCR 반응 buffer 5 μl (750 mM Tris-Cl, 150 mM Ammonium Sulfate, BSA 1 mg/ml, 25 mM $MgCl_2$, pH 9.0), dNTP 2.5 μl (dATP, dCTP, dGTP, TTP 각각 25 mM), Taq DNA polymerase 1.25 μl (2.5 units), 증류수 26.25 μl, sense 및 antisense primer를 각각 2.5 μl (100 pmoles) 씩 섞어 전체 용량을 총 50 μl 되게 하였다. 반응 조건은 pre-denaturation을 94℃에서 5분, denaturation을 94℃에서 30초, annealing을 52℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초, post-extension을 72℃에서 5분간 실시하였다. Pre-denaturation과 post-extension을 제외한 나머지 반응은 모두 35회 실시하였다. PCR 반응물은 미세유리구슬 (glass beads)을 이용하여 정제하였고 최종농도가 200 ng/μl 이상 되도록 조정한 뒤 자동화장치를 이용해 염기서열을 결정하였다.

결 과

KCNE1은 exon과 intron을 포함한 유전자 구조가 비교적 간단하여 전체 coding region이 exon 3 하나에 모두 들어 있다. 그러나 현재 GenBank 등에 보고된 염기서열은 미국인에서 얻어진 결과이므로 온전한 질병 분석을 위해서는 한국인 게놈에서 유전자를 분리하고 한국인 고유의 염기서열을 결정, 확인해야 한다. 실험을 위해 고안한 primer는 모두 4개 (Fig. 1)였으며 이들은 게놈 DNA (blood DNA)에서 exon 3를 직접 증폭해낼 수 있도록 고안되었다. Primer 1F와 1R의 조합은 coding region 전체를 증폭해낼 수 있도록 고안된 것이고, primer 2F와 2R은 첫 번째 primer 쌍으로 증폭된 PCR 산물을 nested PCR하여 KCNE1이 특이적으로 증폭되었는지 여부를 빠르게 검색할 수 있도록 고안된 것이다. Primer 1F와 1R의 위치는 개시코돈인 ATG와 종결코돈인 TGA에 인접하게 디자인함으로써 전체 coding sequence가 정확하게 증폭될 수 있도록 하였다. KCNE1이 정상적으로 증폭되었다는 것이 확인되면 pGemT-easy vector에 클로닝하였고, 자동염기서열결정장치를 이용해 염기서열을 결정하였다. Fig. 2는 이렇게 해서 확인된 KCNE1 mRNA의 전체 염기서열을 요약한 것이다. KCNE1의 coding region은 436 bp였으며, 이는 129개의 아미노산에 해당하는 것이다 (Fig. 2). 본 실험은 임상적으로 증상이 없는 정상 한국인 68명을 대상으로 조사된 결과로서 미국인에서의 보고와 일치하는 것으로 최종 확인되었다[6].

고 찰

유전자 차원에서의 분석이 필수적인 QT 연장증후군에 대하여 우리나라의 연구는 서구에 비해 상당히 늦어졌다는 판단이다. 환자 관리와 통계 처리가 제대로 이루어지지 못한 것이 일차적 이유이지만, 무엇보다도 비교할 수 있는 대조군 염기서열이 보고되지 않았기 때문이다. 게다가 복합유전자에 의한 질환인 만큼 분석 작업량이 굉장히 많은 것도 이 질환 연구에 있어서 어려운 부분이다[5]. 결국 우리 환자를 유전자 진단할 때에도 다른 나라의 데이터를 이용해야 하고, 따라서 이것이 과연 정확한 진단인지에 대한 확신이 없을 수밖에 없는 문제가 항상 뒤따르는 것이다. 최근에 동일 유전자일지라도 인종별로 변이 (SNP 포함)가 있을 수 있다는 것이 알려지게 되었고 그 결과 각 나라별로 자국민의 유전자를 재분석하는 데에 박차를 가하고 있다. 그러나 아직도 우리나라에서는 QT 연장증후군에 대한 유전자 자료가 턱없이 부족한 실정이다. 이러한 이유로 본인의 실험실에서는 QT 연장증후군에 관련된 유전자들을 직접 클로닝하기 위해 수년 전부터 노력해 왔다.

본 연구는 임상적으로 정상적인 한국인의 게놈에서 KCNE1 유전자를 온전히 분리하고, 이의 염기서열을 밝힌 결과 보고이다. KCNE1 유전자는 비교적 작고 exon 3에 전체 coding region이 들어 있었기 때문에 한쌍의 primer로 전체를 증폭한 후 nested PCR을 통해 한번 더 확인하고, 자동염기서열결정장치로 염기서열을 결정하였다.

전체적으로 미국인에서의 보고와 일치하고 있었으며 특이적인 SNP는 exon 상에 없는 것으로 확인되었다[6]. 또한 남녀간의 차이도 특별히 발견되지 않았다. 다만 본 연구와 병행하여 실시한 또 다른 조사에서 폐, 뇌, 간에서는 KCNE1의 발현을 확인할 수 없었다 (data not shown). 본 연구의 결과는 한국인에서의 QT 연장증후군을 정확하게 맞춤 진단할 수 있는 방법을 개발하기 위한 첫걸음이라 할 수 있다. 미국인과의 염기서열이 동일한 것으로 판단되었을지라도 이를 직접 확인한 것은 처음이기 때문이다. 특히 본 연구에서 실시

한 nested PCR을 임상에 응용하면 환자 진단에 신속함과 정확성을 더해줄 수 있을 것으로 기대된다. QT 연장증후군으로 진단받은 환자들의 염기서열을 데이터베이스화하고 진단과 치료를 위한 한국인 특이적 자료를 확보하는 것이 앞으로의 계속 과제이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 중 지역대학우수과학자 연구지원 (2000-1-210-00-001-2)에 의해 수행되었음. 본 연구자들은 윤보연, 성정경, 이형란, 장순영, 김진식, 채근하 학생들의 연구수행 지원에 감사하는 바임.

참 고 문 헌

1) Ben-David J and Zipes D (1993): Torsades de pointes and proarrhythmia. *Lancet*, **341:** 1578.

2) Geelen JL, Doevendans PA, Jongbloed RJE, Wellens HJJ and Geraedts JPM (1998): Molecular genetics of inherited long QT syndromes. *Eur Heart J*, **19:** 1427-1423.

3) Hirao H, Shimizu W and Kurita T (1996): Frequency-dependent electrophysiologic properties of ventricular repolarization in patients with congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, **28:** 1269.

4) Keating MT (1996): The long QT syndrome. A review of recent molecular and physiologic discoveries. *Medicine*, **75:** 1.

5) Jackman W, Friday K and Anderson J (1988): The long QT syndromes: A critical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis*, **31:** 115.

6) Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH and Keating MT (1998): Genomic Structure of Three Long QT Syndrome Genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics*, **51:** 86-97.

7) Viskin S, Alla SR and Barron HV (1996): Mode of onset of torsade de pointes in congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, **28:** 1262.

8) Vincent GM (1995): Heterogeneity in the inherited long QT syndrome (review). *J Cardiovasc Electrophysiol*, **6:** 137.