

Detailed Analysis of the 5'-Coding Region of SCN5A Gene in Korean Genome

Shin Il Yeo, Su Won Kim, Yoon Nyun Kim¹, Kwan Hee You², Song Woo Shin³,
Myoung Hee Kim⁴, Jae Chan Song⁵ and Min Yoo[†]

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

We have identified and analyzed the 5'-coding region of SCN5A gene in Korean genome. Although its sequence has already been reported in western countries it is still important to confirm our own sequence for the establishment of Korean-suitable diagnosis on genetic basis. Total RNAs were obtained from three healthy Korean adult hearts and reversely transcribed. RT products were then subjected to PCR reaction followed by DNA sequencing. Three different sets of SCN5A primers were designed and used for the amplification of 5'-coding region of SCN5A from Korean genome. Amplified sequence was roughly one-10th of the entire SCN5A mRNA in size and its detailed sequence was completely matched up to the previously reported sequence. There was no difference between three heart samples, either. So, SCN5A was concluded as the relatively stable gene comparing to other genes that are involved in long QT syndrome.

Key Words: Long QT syndrome, QT interval, SCN5A

서 론

생활과 식품의 서구화와 함께 선진국형 질병으로만 인식 되어 오던 심혈관 질환들이 우리 사회에서도 급격히 늘어나고 있다. QT 연장증후군 (long QT syndrome)도 이들 중 하나이다. 심전도상의 QT 간격이 정상인보다 길게 연장되고 (0.45 초 이상), T파 변형이나 서맥을 동반하는 이 질환의 심각성은 오래 전부터 인식되었지만 유전자 차원에서의 진단은 아직 어려운 현실이다^{3,5-7,10,11}). QT 연장증후군을 두려워하는 이유는 평소 증상이 없다가도 운동이나 스트레스에 의해 돌연사할 수 있기 때문이다. 더구나 한국인에서는 기초적인 유전자 분석이나 통계 자료조차 미비한 실정이다.

QT 연장증후군을 연구하는 데에 가장 큰 장애는 복합유전자 질환 (multigene defect)이라는 점이다. 이 질환에 관여하는 유전자만도 최소 4개 이상일 것으로 보고있으며, 유전자별로는 Type I (KVLQTI), Type II (HERG), Type III (SCN5A),

Type V (KCNE1)로 분류를 하고 있다^{8,9}). Type IV의 유전자는 염색체 4번에 위치한 것으로 추정을 하지만 아직 그 실체가 분명하지 않다. 그 동안 몇몇 환자에서 알려진 변이 (genetic variation)들도 유전자 Type이나 위치가 다양해서 특정한 한 가지에 초점을 맞추어 진단하기란 사실상 불가능하다. QT 연장증후군의 새로운 돌연변이와 SNP는 전 세계적으로 보고되고 있는데 대부분의 연구가 미국을 중심으로 이루어지고 있고, 한국에서는 아직 유전자 차원에서의 기초 분류조차 제대로 되어 있지 못한 형편이다.

유전성 질환에 접근하는 방법은 여러 가지가 있다. 그러나 가장 직접적인 것은 환자에서 해당 유전자의 mRNA와 유전자를 분리하여 염기서열을 완전히 속독하는 것이다. QT 연장증후군의 유전자 분석이 어려운 이유가 바로 여기에 있다. 수술을 하지 않는 한 환자로부터 제공될 수 있는 조직은 혈액 뿐인데 이로부터는 QT 연장증후군의 mRNA를 분리할 수 없기 때문이다. SCN5A 유전자도 전혀 예외가 아니며, 더구나 intron과 exon이 복잡하게 공존하는 게놈 DNA에서 SCN5A를 직접 분석해내기란 여간 어려운 일이 아닐 수 없다^{1,4}). 그러나 다행스러운 것은 5'-coding area에 돌연변이가 집중된 hot spot이 있을 것이라는 예상이다. 즉, SCN5A 유전자는 5'을 집중적으로 분석하는 것이 중요하다는 것이다.

최근에 우리는 임상적으로 정상이라 판명된 한국인의 심

*논문 접수: 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

Primer	Sequence	Relative Position
1S	ATGAGAAGATGGCAAACCTTCCTATTAC	1~27
2AS	GCGTTGGTGGCACTGAACCGGAAGAT	312~338
3S	AGAGCCCCTGGAGGACCTGGACCCCTT	239~265
4AS	ACTAAAGTCCAGCCAGTTCCATGGGTC	578~605
5S	GAGTCTCTGGTCAAGATTCTGGCTCGA	519~544
6AS	GCGTTGAGCGCTGTGAAGTTGCGCAC	849~875

Fig. 1. Primers to be used for the amplification of SCN5A.

장조직에서 SCN5A mRNA를 분리하였고 hot spot이 모인 것으로 예측되는 5'-domain 분리와 분석에 성공하였다. 물론 이미 미국에서 SCN5A 염기서열을 보고한 적이 있지만 한국인에 맞는 유전자 진단법을 개발하려면 한국인 계통에서 직접 그 염기서열을 재확인해야 함은 너무도 당연한 필수 사항이다. 본 연구는 SCN5A를 한국인에서 분리하기 위한 전략을 개발하고, 변이의 hot spot이 있을 것으로 생각되는 5'-coding region을 분석한 결과에 대한 간략한 보고이다. 본 연구를 통해 SCN5A 유전자의 온전한 분석과 한국인 고유의 진단법 개발이 더욱 촉진될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 재료

Taq DNA polymerase와 dNTP 등 PCR 반응 관련 제품은 Takara (Japan)에서 구입하였다. Primer는 (주)바이오니아 (Korea)에 의뢰하여 제작하였다. Reverse transcription kit은 Takara (Japan)와 QIAGEN (Germany)의 제품을 사용하였으며 pGemT-easy vector와 100 bp ladder, plasmid isolation kit 등은 Promega (USA)에서 구입하였다. 한국인의 total heart RNA는 (주)바이오니아에서 분양받았다. 기타 일반 시약은 Merck Chemical Company (USA), Sigma Co. (USA) 등의 제품이었다. DNA sequencing은 (주)마크로젠 (Korea)에 의뢰하였다. 각종 초자기구와 시험관, petridish 등은 일회용품을 사용하였다. 재할용품목들은 121°C에서 30분간 고압증기멸균한 뒤 사용하였다.

2. 방법

(주)바이오니아에 total heart RNA를 주문하였고, 3회에 걸쳐 연속적으로 분양받았다. 매 분양마다의 심장 RNA는 서로 다른 사람으로부터 구해진 것으로서 임상학상 건강하다고 판명된 성인의 심장에서 추출된 것이었다. 먼저 total heart RNA 8~10 µl를 주형으로 하여 reverse transcription (RT)하였고, 반응물 2~4 µl를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

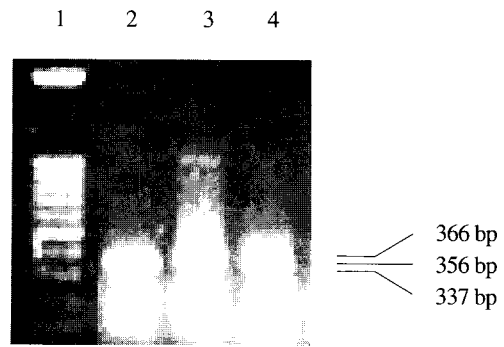


Fig. 2. Results of the PCR amplification followed by electrophoresis. Lanes 1, 2, 3, 4 represent 100 bp ladder, 337 bp (by primers 1S and 2AS), 366 bp (by primers 3S and 3AS), 356 bp (by primers 5S and 6AS), respectively.

RT 반응과 PCR 반응의 실험 조건은 kit를 판매한 회사의 처방전에 따라 실시하였다. PCR 반응은 pre-denaturation을 94°C에서 5분, denaturation을 94°C에서 30초, annealing을 52~65°C에서 30초, extension을 72°C에서 1분, post-extension을 72°C에서 5분간 실시하는 조건에서 이루어졌다. Pre-denaturation과 post-extension을 제외한 나머지 반응은 모두 35~40회 실시하였다. PCR 반응물은 pGemT-easy vector에 클로닝하였고 color selection으로 결과를 확인한 후 plasmid를 분리해 농도를 300 µg/µl로 맞추었고, 자동염기서열반응으로 염기서열을 결정하였다.

결 과

SCN5A는 intron의 염기서열이 채 밝혀져 있지 않기 때문에 각 exon을 좌·우에서 증폭할 수 있는 primer의 제작은 전혀 불가능하였다. 따라서 계통 DNA에서 exon을 직접 증폭하는 것은 어려웠고 대신 심장에서 추출한 mRNA를 역전사하여 PCR 증폭하는 것이 최상의 방법이었다. 임상적으로 건강하다고 판명된 한국인의 심장 RNA를 total RNA의 형태로 3회에 걸쳐 분양받았다. 매회마다 농도와 분해 정도 (degradation 정도)에서 조금씩 차이를 보이지만 전체적으로는 균일한 RNA가 분양되었다. PCR 반응을 위한 primer는 미국에서 보고된 cDNA 염기서열에 근거해 제작하였는데 일단 전체를 3등분하여 이중 5'-domain만을 중점적으로 증폭하기로 결정하였다²⁾. 5'-domain을 다시 셋으로 나누었고, 이들이 서로 겹쳐서 증폭될 수 있게 primer를 고안하였다. 실험에 사용된 primer의 종류와 염기서열, 그리고 대략적인 위치는 Fig. 1에 요약하였다.

본 연구에서 증폭한 염기서열은 SCN5A의 5'-coding region으로서 변이가 상당히 많은 hot spot일 것으로 예상되는 부분이었다. 크기로는 전체 (8,491 bp)의 약 1/10에 해당하는 부분

C	C	T	C	C	A	C	C	C	T	G	G	A	C	C	A	A	G	T	A	T	G	T	C	G	A	G	T	A	C	-494
P			P				W			T		K			Y		V			E		Y							-162	
A	C	C	T	T	C	A	C	C	G	C	C	A	T	T	T	A	C	A	C	C	T	T	T	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	-524
																													5 S	
T		F			T		A			I		Y			T		F			E		S							-172	
C	T	G	G	T	C	A	A	G	A	T	T	C	T	G	G	C	T	C	G	A	G	C	T	T	T	C	T	G	C	-554
L		V			K		I			L		A			R		A			F		C							-182	
C	T	G	C	A	C	G	C	G	T	T	C	A	C	T	T	T	C	C	T	T	C	G	G	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	-584
																													4 A S	
L		H			A		F			T		F			L		R			D		P							-192	
T	G	G	A	A	C	T	G	G	C	T	G	G	A	C	T	T	T	A	G	T	G	T	G	A	T	T	A	T	C	-614
W		N			W		L			D		F			S		V			I		I							-202	
A	T	G	G	C	A	T	A	C	A	C	A	A	C	T	G	A	A	T	T	T	G	T	G	G	A	C	C	T	G	-644
M		A			Y		T			T		E			F		V			D		L							-212	
G	G	C	A	A	T	G	T	C	T	C	A	G	C	C	T	T	A	C	G	C	A	C	C	T	T	C	C	G	A	-674
G		N			V		S			A		L			R		T			F		R							-222	
G	T	C	C	T	C	C	G	G	G	C	C	C	T	G	A	A	A	A	C	T	A	T	A	T	C	A	G	T	C	-704
V		L			R		A			L		K			T		I			S		V							-232	
A	T	T	T	C	A	G	G	G	C	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	C	G	T	G	G	G	G	G	C	C	-734
I		S			G		L			K		T			I		V			G		A							-242	
C	T	G	A	T	C	C	A	G	T	C	T	G	T	G	A	A	G	A	A	G	C	T	G	G	C	T	G	A	T	-764
L		I			Q		S			V		K			K		L			A		D							-252	
G	T	G	A	T	G	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	T	C	T	T	C	T	G	C	C	T	C	A	G	C	-794
V		M			V		L			T		V			F		C			L		S							-262	
G	T	C	T	T	G	C	C	C	T	C	A	T	C	G	G	C	C	T	G	C	A	G	C	T	C	T	T	C	-824	
V		F			A		L			I		G			L		Q			L		F							-272	
A	T	G	G	G	C	A	A	C	C	T	A	A	G	G	C	A	C	A	A	G	T	G	T	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	-854
																													6 A S	
M		G			N		L			R		H			K		C			V		R							-282	
A	A	C	T	T	C	A	C	A	G	C	G	C	T	C	A	A	C	G	G	C									-875	
N		F			T		A			L		N			G														-289	

Fig. 3. Sequence of the 5'-coding region of SCN5A gene from Korean genome. Relative positions for the initiation codon (ATG) and primers are indicated as boxed or underlined.

고찰

SCN5A는 intron에 대한 정보가 충분하지 못해 혈액에서 분리한 게놈 DNA로부터 exon을 직접 증폭하는 것이 쉽지가 않았다. 따라서 우리는 심장에서 RNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 PCR 방법으로 증폭해내기로 결정하였다. 실험에 사용한 모든 primer는 PAGE 정제하여 사용하였다. Primer 마다

annealing temperature가 다르기 때문에 일일이 한 쌍씩 점검하면서 PCR 조건을 확립하였다. 유전자가 상대적으로 크고, 구조 역시 복잡하기 때문에 돌연변이의 hot spot이 모여 있을 것으로 예상되는 5'-coding region을 집중 분석하기로 전략을 세웠다.

그러나 문제는 심장 RNA를 구하기가 쉽지 않다는 것이었다. 심장조직은 파쇄가 어려워 RNA 추출이 쉽지 않았고, 분양받는 RNA의 경우 상당히 분해된 경우 또한 여러 번 있

었기 때문이다. 또 다른 문제점은 SCN5A의 5' 부분에는 GC 서열이 상대적으로 풍부하기 때문에 annealing temperature가 상대적으로 높아야 하고, 이는 primer 제작과 전체 PCR 반응에 영향을 미칠 수 밖에 없기 때문이었다. 결과적으로 본 연구에서 증폭한 5' 부분은 약 1/10에 해당하는 875 bp였고 아미노산 289개에 해당하는 것이다.

본 연구는 일단 정상적인 한국인을 대상으로 실험 조건을 확립하고, 분석 방법을 개발한 것이다. 앞으로 환자의 조직을 직접 얻을 수 있다면 그 조직에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 만들고, 보다 근원적으로 QT 연장증후군의 원인이 비교 조사될 수 있을 것이다.

본 연구는 한국인의 QT 연장증후군에 대한 분자유전학적 기초를 마련할 것으로 본다. 아직 QT 연장증후군에 대한 초기 진단이 유전자 차원에서는 거의 이루어지지 못하고 있지만 앞으로 보다 근원적이고 확실한 진단과 치료법의 개발이 기대된다.

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) An R-H, Bangalore R, Rosero SZ and Kass RS (1996): Lidocaine block of LQT-3 mutant human Na⁺ channels. *Circ Res*, **79**: 103-108.
- 2) Gellens ME, George AL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL and Kallen RG (1992): Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 554-558.
- 3) Geelen JLMC, Doevendans PA, Jongbloed RJE, Wellens HJJ and Geraedts JPM (1998): Molecular genetics of inherited long QT syndromes. *Eur Heart J*, **19**: 1423-1427.
- 4) George AL, Varkony TA and Drabkin HA (1995): Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage gated sodium channel α -subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet*, **68**: 67-70.
- 5) Keating M, Atkinson D, Dunn C, Timothy K, Vincent GM and Leppert M (1991): Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science*, **252**: 704-706.
- 6) Keating M, Dunn C, Atkinson D, Timothy K, Vincent GM and Lepper M (1991): Consistent linkage of the long QT syndrome to the Harvey ras-1 locus on chromosome 11. *Am J Hum Genet*, **49**: 1335-1339.
- 7) Schott JJ, Charpentier F and Peltier S (1995): Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet*, **57**: 1114-1122.
- 8) 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.
- 9) Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC and Keating MT (1997): Mutations in the hminK gene causing long QT syndrome and suppress I_{ks} function. *Nature Genet*, **17**: 338-340.
- 10) Wang Q, Curran ME and Splawski I (1996): Cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genet*, **12**: 17-23.
- 11) Warmke JE and Ganetzky B (1994): A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 3438-3442.