

Tandem Repeats (CCTTT)_n in the Promoter of iNOS Gene in Korean Genome

Sun-Ah Baek and Min Yoo[†]

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

Nitric oxide is an important factor to regulate the biochemical reactions in the body such as expansion of blood vessel, neural conduction and antimicrobial activity. There are two forms of nitric oxide synthase and iNOS has attracted most attention because it is involved in the development of diabetes and cardiac disease condition. There are several regulatory sequences in the promoter region of iNOS gene. One of them is (CCTTT)_n. It has been reported that the number of tandem repeat of (CCTTT)_n varies from population to population. So, we analyzed (CCTTT)_n polymorphism in Korean genome for the purpose of comparison. According to our present study Koreans are different from other Asians reported previously because (CCTTT)₁₀ is the highest incidence as opposed to (CCTTT)₁₂ for other countries. This study should facilitate the understanding of the expression of iNOS gene in different population.

Key Words: iNOS, Tandem repeat, Polymorphism, Korean genome

Nitric oxide (NO)는 포유동물에서 생성되는 생화학물질로서 혈관 확장, 신경 전달, 항균 작용 등 중요한 생물학적 반응에 관여하기 때문에 집중적으로 연구 대상이 되고 있다 (Bardell et al., 2001; Kuo et al., 1996). 지금까지 알려진 NO 생성 효소로는 constitutive nitric oxide synthase (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)의 2 종류가 있는데 특히 iNOS는 대식세포에서 활성화되기에 면역 반응에 깊숙이 관여한다 (Chio et al., 2003). 염증이 생기면 대식세포는 활성화되고 결과적으로 다량의 NO를 유리시켜서 체내 방어 및 조직 재생이 가능하게 해준다 (Chiou et al., 2001). 한편 당뇨병을 유발시킨 토끼에서 iNOS가 증가하면 합병증으로 신장 장애를 나타낸다는 보고가 있어 iNOS의 체내 작용이 예상보다 훨씬 복잡할 수 있다는 추측을 낳고 있다. 신장 장애는 결과적으로 심혈관계 질환을 유발할 수 있기 때문에 당뇨병 환자가 어떤 기작에 의해 동맥경화증이나 뇌졸중에 걸릴 확률이 더 높은지를 설명할 수 있는 모델이 될 수 있을 것으로 기대된다. iNOS에 대한 그 동안의 연구에도 불구하고 아직 인종별 다양성과 그에 따른 질환 연관성에 대해서는 보고가 미흡한

실정이다. iNOS 유전자에서 관심의 대상은 프로모터 (promoter) 부분이다. iNOS의 조절부위 중 (CCTTT)라는 짧은 염기서열이 계속적으로 반복되는 패턴을 보이기 때문이다 (Johannesen et al., 2000). 아직 완전하지는 않으나 이 염기서열의 반복 숫자가 어떤 나라에서는 당뇨병 및 그 합병증과 연관되어 있다는 보고도 있다 (Liao et al., 2005). 현재 추측으로는 DNA 결합단백질 (DNA binding protein)이 중합체 (polymer) 형태로 이 부위에 달라붙어 iNOS 활성을 조절할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 한국인의 iNOS 프로모터 다양성을 조사하기 위해 (CCTTT)_n에 해당하는 부분을 증폭하여 염기서열을 결정한 뒤 통계 처리하고, 다른 나라에서 보고되었던 자료와 비교하여 한국인만의 특이적 다양성이 존재하는지 여부를 결정하였다. 실험에 사용된 표본은 계명대학교 학생 중 당뇨병이나 심혈관계 질환에 대해 임상적 소견이 없는 사람들을 선택하였다. 총 48명의 자원자로 부터 DNA 추출을 위해 자발적인 서면 동의하에 혈액을 채취하였다. 기타 모든 검사는 임상시험 심사위원회 [Internal Review Board (IRB)]의 기준에 맞게 실시하였다. Genomic DNA는 QIAamp DNA Minikit을 사용해 추출하였고, PCR primer는 (주) Bioneer (Korea)에 의뢰하여 제작하였다. Taq DNA polymerase와 dNTP, TA cloning vector 등은 (주) Solgent (Korea) 회사 및 Promega (USA)의 제품을 사용하였다. DNA sequencing은 (주) Macrogen (Korea)에

*논문 접수: 2009년 6월 2일

수정 접수: 2009년 6월 20일

[†]교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 생물학과

Tel: 053-580-5537, Fax: 053-580-5953

e-mail: ymin@kmu.ac.kr



Fig. 1. Representative results of PCR amplification for (CCTTT)_n region of iNOS gene.

의뢰하였고, PCR 기기는 TaKaRa (Japan)의 TP600 모델을 사용하였다. 실험 과정을 요약하면 다음과 같다. 채취한 혈액을 proteinase k를 미리 분주해 둔 시험관에 넣고 간단히 혼합한 뒤 -70℃에 약 2시간 보관하였다. 세포막을 터뜨리기 위해 0.2% SDS가 포함된 lysis buffer를 처리하고 56℃에서 10분간 방치한 뒤 원심분리하였다. 상층액을 따로 모으고 여기에 100% ethanol을 첨가하여 DNA가 분리되는 것을 확인한 후 다시 한 번 원심분리하였다. 상층액을 glass column 위에 부어 DNA만 순수하게 분리한 뒤 70% ethanol로 2회 세척하여 4℃에 보관하면서 필요할 때마다 분주하여 사용하였다. PCR primer는 GenBank (X97821)에 보고된 염기서열을 참조하여 제작하였다. (CCTTT)_n 유전자 다형성 부분이 증폭될 수 있도록 하기 위하여 좌우 바깥쪽 염기서열을 근거로 하였으며 primer의 길이는 최소 17 bp 이상으로 하여 통계상 동일 게놈 (genome) 내에서 잘못된 염기가 증폭되는 일이 없도록 하였다. Sense primer와 antisense primer의 염기서열은 각각 CCTTCTCACAGCTTGCCACCCCTGG, AGAGGCTGCAGAGAGCTAT GGTCGC이었다. PCR 반응은 pre-denaturation을 94℃에서 5분, denaturation을 95℃에서 30초, annealing을 59℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초로 하여 총 35회 반복하였다. 반응 후에는 post-extension을 위해 72℃에서 7분간 추가 반응시켰다. 반응이 끝난 PCR 산물은 TA vector에 클로닝한 뒤 DNA 염기서열을 결정하였다.

Fig. 1은 PCR 반응물을 전기영동한 결과이다. 전체적으로 48개의 샘플이 다양한 양상을 나타냈기 때문에 Fig. 1에는 대표적 샘플들의 결과만 나타내었다. 전기영동의 결과만으로도 (CCTTT)_n의 반복이 개인별로 상당한 차이를 보이는 것을 알 수 있었다. 대부분의 사람들이 두 종류의 DNA band를 보인 반면 (lanes 1~5, 7, 8, 10, 11) 단일 band (lanes 6, 9)를 나타낸 경우도 발견되었다. 두 개의 band를 보이는 경우는 상동염색체에 위치한 iNOS 유전자가 각각 서로 다르기 때문으로 해석되었다. 즉 양쪽 부모로부터 서로 다른 iNOS 유전자를 전해 받았기 때문으로 판단되었다. 이처럼 한국인 게놈에 존재하는 iNOS 유전자는

Table 1. Frequency of (CCTTT)_n of iNOS gene in Koreans

| | Male | Female | Total |
|-----------------------|--------------------|-------------|--------------|
| | Number / Total (%) | | |
| (CCTTT) ₉ | 1/11 (9.1) | 2/37 (5.4) | 3/48 (6.2) |
| (CCTTT) ₁₀ | 1/11 (9.1) | 9/37 (24.4) | 10/48 (20.8) |
| (CCTTT) ₁₁ | 1/11 (9.1) | 5/37 (13.5) | 6/48 (12.5) |
| (CCTTT) ₁₂ | 3/11 (27.25) | 6/37 (16.2) | 9/48 (18.7) |
| (CCTTT) ₁₃ | 3/11 (27.25) | 3/37 (8.1) | 6/48 (12.5) |
| (CCTTT) ₁₄ | 1/11 (9.1) | 6/37 (16.2) | 7/48 (14.6) |
| (CCTTT) ₁₅ | 1/11 (9.1) | 4/37 (10.8) | 5/48 (10.4) |
| (CCTTT) ₁₈ | 0/11 (0) | 1/37 (2.7) | 1/48 (2.1) |
| (CCTTT) ₂₁ | 0/11 (0) | 1/37 (2.7) | 1/48 (2.1) |

상당히 복잡한 패턴을 나타내었는데 이는 개개인의 다양성과 함께 그 다양성이 조합을 이루었을 때 더욱 복잡한 결과를 낳기 때문으로 해석될 수 있다 (Lee et al., 2008). 한편 전기영동 상에서는 비록 동일 band로 보였을지라도 서로 염기서열이 조금 다른 iNOS 유전자가 섞여 있을 수도 있기 때문에 gel로부터 해당 band를 추출한 뒤 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 그러나 그 결과 lane 6, 9의 샘플들은 전기영동에서 예측했던 것처럼 동일 iNOS 유전자가 상동염색체에 존재하는 것으로 판명되었다.

Table 1에서 보듯이 남·여를 통틀어 통계 처리한 결과 (CCTTT)_n의 n 값은 대체로 10~15 사이에 분포하였지만 전체적으로는 9에서 21까지 다양하였다. 다만 남자에서는 16개 이상의 반복서열이 관찰되지 않은 반면 여자에서는 18, 21개의 반복서열도 발견되었다. 한국인에서 가장 빈도가 높은 것은 (CCTTT)₁₀으로서 20.8%였고 그 다음은 (CCTTT)₁₂가 18.7%, (CCTTT)₁₄가 14.6%의 순서였다. (CCTTT)₁₁과 (CCTTT)₁₃도 각각 12.4% 씩 발견되었다. 특이할 것은 남자에서 (CCTTT)₁₂와 (CCTTT)₁₃이 가장 많이 발견된 반면 여자에서는 (CCTTT)₁₀이 제일 빈도가 높았다는 점이다. 이것이 실제로 남·녀 간의 유전적 차이를 대변하는 것인지 아니면 모집단의 수를 늘려 갈 때 점차 비슷한 통계를 보이게 될지 현재로서는 알 수가 없다. Table 1의 결과를 비교 목적으로 그래프화 시켜 표시한 것이 Fig. 2이다.

iNOS 유전자 다형성에 대한 연구는 아시아와 아프리카, 미주지역 등 다양한 범위에서 활발하게 진행되어 왔다 (Lee et al., 1996; Martin et al., 2005; Seo et al., 2000). 인종적으로도 중국계, 흑인계, 백인계 등 여러 민족에서 골고루 연구되어 오고 있다. 예외적으로 덴마크 사람의 iNOS 유전자에서 n=14가 보고된 적이 있고, 아프리카 사

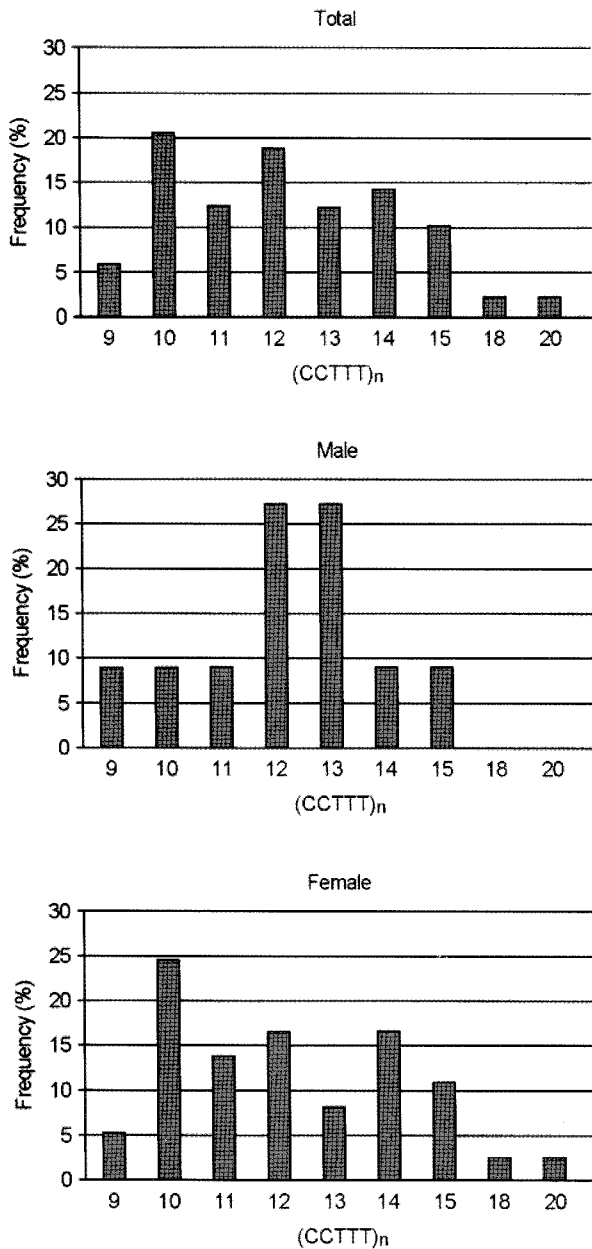


Fig. 2. Comparison of frequency of (CCTTT)_n in males and females.

람들에서 n=13이 높게 보고되기는 하였지만, 기타 보고들에 의하면 인종이나 지역에 상관없이 (CCTTT)₁₂가 가장 많이 나타나는 반복서열이었다. 심지어는 당뇨 합병증으로 신장 장애를 겪고 있는 사람과 정상인 사람을 비교한 싱가포르에서도 (CCTTT)₁₂가 가장 높게 확인되었다. 본 연구에 의하면 한국인에서도 분명히 (CCTTT)₁₂와 (CCTTT)₁₃가 상당히 높은 비율로 확인되었다. 그러나 상대적으로 (CCTTT)₁₀이 더 높았다는 것은 특이할 점이라 하겠다. iNOS 유전자의 나라별 다형성 조사가 중요한

이유는 당뇨 및 그 합병증과 관련이 깊어 성인병 예방과 치료에 중요한 생화학적 지표가 되기 때문이다.

본 연구는 아직 기초 자료 조차 없는 한국인의 iNOS 유전자 다형성에 대해 유전적 근거를 마련했다는 데서 그 의미를 찾을 수 있다. 앞으로 지속적으로 모집단을 늘리고 환자와의 대조 실험을 거쳐 iNOS에 대해 유전자 차원에서의 신속 정확한 진단 방법을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

REFERENCES

- Baik SW, Song SK, Kim HK, Kwon JY, Shin SW. The effect of isoflurane on the expression of iNOS mRNA in endotoxemic rats. *Kor J Anesthesiol.* 2000. 38: 1047-1053.
- Bardell AL, Macleod KM. Evidence for inducible nitric-oxide synthase-expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin diabetic rats. *J pharmacol Exp Ther.* 2001. 296: 252-259.
- Chio KH, Noh HJ, Kim BS, Kang SW, Han DS, Lee HY. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is increased in diabetic rat glomeruli: role of angiotensin II (AII). *The Kor J Nephrol.* 2003. 22: 366-373.
- Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001. 69: 625-635.
- Lee HR, Yoo M. Polymorphism of KCNE1 Gene in Korean Population. *J Exp Biomed Sci.* 2008. 14: 123-126.
- Johannesen J, Tarnow L, Parving H, Nerup J, Pociot F. CCTTT-repeat polymorphism in the human NOS2-promoter confers low risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000. 23: 560-562.
- Kuo ML, Chau YP, Wang JH, Shiah SG. Inhibitors of Poly (ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not different in human leukemia HL-60 Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 219: 502-508.
- Lee KY. The pathophysiological roles and clinical implications in circulatory system. *The YongNam Univ Mad J.* 1996. 13: 159-172.
- Liao L, Lim MC, Chan SW, Zhao JJ, Lee KO. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and nephropathy in asians with type 2

diabetes. *J Diabetes Complications* 2005. 20: 371-375.

Martin J, Paco L, Ruiz MP, Lopez-Nevot MA, Garcia-Porrúa C, Amoli MM, Calvino MC, Ollier WER, Gonzalez-Gay. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to henoch-schonlein purpura in north-western spain. *J Rheumatol*. 2005. 32: 1081-1085.

Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*. 2000. 35: 21-28.
