

영지에서 Histone Deacetylase 유전자의 부분 클로닝

김선경 · 금주희 · 최형태*

강원대학교 생명과학부 미생물학과

염색질을 구성하는 histone 단백질 lysine 잔기에 histone acetylase에 의하여 결합된 acetyl기를 제거하는 histone deacetylase (HDAC)는 진핵세포 생물의 염색질 안정화 및 유전자 발현에 매우 큰 영향을 미친다. 국내에서 분리된 영지의 HDAC 유전자를 클로닝 하고자 cDNA 및 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행한 결과 470 bp의 cDNA 유전자와, 585 bp, 589 bp 및 630 bp 길이의 genomic DNA 유전자 조각을 클로닝 하였다. 이들의 염기서열을 근거로 아미노산 서열을 다른 균류의 HDAC와 비교한 결과 59-72%의 상동성을 보였다.

Key words □ *Ganoderma lucidum*, histone deacetylase, PCR

진핵생물의 핵에 있는 DNA는 histone 단백질과 복합체를 이루어 염색질을 생성한다. 염색질은 구슬모양의 nucleosome과 이를 연결하는 실 모양으로 이루어졌고 총 5 종류의 histone 단백질들이 관련되어 있다. 이 histone 단백질의 N-terminal 지역은 염기성 아미노산인 lysine이 많이 분포하고 있어 DNA의 인산기와 반응하여 DNA-protein complex를 이룰 수 있고 이러한 구조가 염색질의 안정화에 상당한 효과를 미친다. 한편 histone 단백질에 다양한 변형이 나타나는데 아세트화, 메틸화 및 인산화 등 비교적 간단한 화합물이 결합하여 염색질의 구조적 변화를 유도한다. 특히 nucleosome의 core에 존재하는 histone의 아세트화는 lysine에 acetyl 기를 결합시킴으로써 histone의 양전하를 감소시키고, 따라서 DNA-histone의 결합이 느슨하게 된다. 이러한 histone의 아세트화 결과 유전자 발현조절에 관련된 다른 단백질들이 DNA에 접근하는 것이 용이하게 된다(12).

Nucleosome core에 존재하는 histone의 아세트화는 histone acetyltransferase (HAT)에 의하여 진행되고, histone deacetylase (HDAC)에 의하여 제거된다. 즉 탈아세트화 작용에 의하여 다시 DNA-histone의 결합이 안정화되므로 유전자의 발현이 적절하게 조절되기 위하여 histone deacetylase의 역할도 매우 중요하다. 효모에서 밝혀진 HDAC들은 단백질 조성에 따라 세 가지로 나눈다. 전사의 조절자인 RPD3는 class I에(11), HDA1 계열은 class II에(10), SIR2 계열은 class III(2)의 각 대표들로서 이들에 대한 상당한 연구가 수행되고 있다. 최근에 옥수수에서 네 번째 class인 HD2가 보고되었으며(9), 아기장대에서 HD2 ortholog인 AtHD2A의 발현을 억제시킨 결과 종자발육이 초기단계에서 매우 지연됨이 보고되었다(13).

영지 (*Ganoderma lucidum*)는 오래 전부터 약용으로 사용되어 약리효과에 대한 연구는 활발한 반면, 기초적인 분자생리학적 연

구는 매우 미미한 실정이다. 국내에서 분리된 영지의 laccase 동위효소에 대한 생화학적 분석(7) 및 형질전환에 대한 연구(5)를 수행한 본 연구진은 이들의 유전자 발현을 조절하는 기작을 연구하는 기초로서 histone deacetylase 유전자의 클로닝을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 염색체 DNA 분리

영지 ASI 7071-9 monokaryon은 완전배지인 SGCM(7)에서 배양하였다. 염색체 DNA는 proteinase K-CTAB을 사용하는 Leem 등(8)의 방법에 따라 분리하였다.

cDNA library 제조

SGCM 액체배지에서 24시간 진탕배양하고 균체를 모아 SMART (Switching Mechanism At the 5'-end of RNA Transcript) PCR cDNA Library Construction kit (Clontech)을 사용하여 Kim 등(6)의 방법에 따라 cDNA library를 구축하였다.

Histone deacetylase 유전자 조각의 증폭

Graessle 등(1)이 보고한 primer 중 forward primer (OA: 5'-GGNCAAYCCNATGAARCC-3')와 reverse primer (A2R: 5'-ACNCRTCNCRCRTGRTG-3')를 유전자 증폭실험에 사용하였다. 염색체 DNA와 cDNA를 주형으로 사용하는 PCR 실험의 수행조건은 95°C에서 5분간 1 차례 변형하고, 95°C 1분, 54°C 1분, 72°C 2분 반응을 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 7분간 1회 증폭하였다. 증폭된 유전자 조각은 agarose gel로 분석하였고, gel로부터 해당 band를 용출하여 pGEM-T vector에 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열이 확인된 유전자는 NCBI의 Blast-x를 사용하여 보고된 유전자와 상동성을 비교하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 033-250-8543, Fax: 033-241-4627
E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr

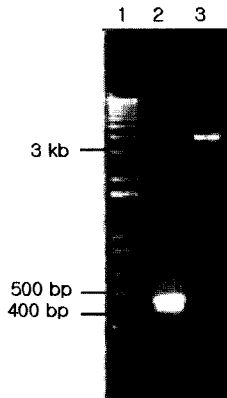


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product by OA and A2R primers using cDNA library as the template for histone deacetylase gene in *G. lucidum*. Lanes 1, 1 kb DNA molecular weight marker; 2, PCR product (*hdc1*); 3, fragment of *hdc1* cloned into pGEM-T vector.

결과 및 고찰

cDNA library를 주형으로 한 HDAC 유전자의 부분 클로닝 실험결과 470 bp 길이의 DNA를 확인하였고 *hdc1*으로 명명하였다 (Fig. 1). 이를 pGEM-T vector에 클로닝하고 제한효소 *ApaI*으로 가수분해한 결과 3.5 kb 길이의 재조합된 plasmid를 얻었고(Fig. 1), 이의 염기서열을 분석하였다(Fig. 2). 영지의 genomic DNA로부터 HDAC 유전자를 클로닝하기 위하여 PCR을 수행한 결과 약 590 bp, 630 bp 및 750 bp 길이의 증폭된 유전자 조각을 확인하였다(Fig. 3). 가장 큰 750 bp 길이의 유전자 조각을 확인한 결과 reverse primer만으로 증폭된 DNA 조각임을 확인하여 이는 실험에서 제외시켰고, 590 bp 및 630 bp 길이의 유전자에 대한 분석을 수행하였다. 각각의 DNA를 gel로부터 용출하고 이를 pGEM-T vector에 클로닝하여 대장균 (XL-1 blue)에 도입하였다. 형질전환된 대장균 50여개로부터 재조합된 T-vector를 분리하고 제한효소 *ApaI*으로 가수분해한 결과 590 bp DNA 조각이 거의 동일한 길이를 가진 2개 조각의 혼합인 것을 확인하였다(Fig. 3). 이들 585 bp, 589 bp 및 630 bp 길이의 HDAC 유전자 조각을 각각 *hda1*, *hda2*, *hda3*로 명명하고 이들의 염기서열을 분석하였다(Fig. 4A, B, C). 영지로부터 확보한 4가지 HDAC 유전자 조

```

1  GGTCACCCGA TGAAACCCCA GCGGATGCGT ATTACACATG AGCTCCTCAC
51  GCGGTACGAC ATGCTCCECA AGATGCGCGT CCTAAGAGCA AAACGGCAA
101 CCGCGGAGGT GATGTCCAAG TTCCACACCG AGAATACGT GCACTTTCTC
151 TCTAGAGTCA CACCGACAA CTCAAGAGAA CTCACGTACA ACGGGTATCA
201 ATTCCTCGTG AGCGACGACA ACCCGCTTT CGAGGGTGTG TTCGAGTTCT
251 GCTCGATATC CGCGGGAGGG TCTGTCCCGG CGGCCCAACG ACTGATGGAG
301 GGCCAGTGCG ATATCGCCAT TAAGTGGGCC GGCGGTCTGC ACCACGGCAA
351 AAAGCGCGAG GCCTCGGGT TCTGCTATAT CAACGACATC GTCCTCGGAA
401 TCCTCGAAAT GCTCCGCACC GTCCCGCGG TCCTCTACAT CGACATCGAC
451 TGCCACCACG GCGATGGCGT
    
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of *hdc1*. The primer sequences of OA and A2R used in the *hdc1* amplification were underlined.



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products using genomic DNA as the template for histone deacetylase gene in *G. lucidum*. Lanes 1, 1 kb DNA molecular weight marker; 2, PCR products (*hda1*, *hda2*, *hda3*); 3-5, fragments of *hda1-3* cloned into pGEM-T vector.

각을 cDNA인 *hdc1*에 근거하여 아미노산 서열을 추정하였고, 이들을 보고된 *Aspergillus nidulans*의 RPD와 HOSA, *Saccharomyces cerevisiae*의 RPD3와 HOS2의 아미노산 서열과 비교하였다(Fig. 5). 영지 HDAC 유전자의 아미노산 서열은 다른 균류의 HDAC

```

(A) 1  GGGCACCCGA TGAAACCCCA GCGGATGCGT ATCAGCATG AGCTCCTCAC
51  GCGGTACGAC ATGCTCCECA AGATGCGCGT CCTAGTGAAG CCCCCCTTA
101 ACTCTGCGCG CCACTCTCAT GCTGTAGCG TCCCGACAGC AGAGCAAAAC
151 GCGCAACCGC GGAGGTGATG TCCAAGTTCC ACACCGACGA ATACGTGCAC
201 TTTCTCTCTA GAGTCACACC CGACAACCTA AGAAGACTCA CGTACAACGG
251 GTATCAATTC CTGGTGGGGC ACGACAACCC CGCTTTCGAG GGTGTGTTCG
301 AGTTCTGTTT GATATCCGCG GGAGGGTCTG TCGGTGCGCG TACTCCCTC
351 GTGTCCITGG GTTCTTTGGC CCGACTCATG CTGTGTGGCC AGCCGCGGCC
401 CAACGACTGA TGGAGGGCCA GTGGGATAT GGCATTAAC TGGCGGGGG
451 TCTGCACCAC GCGAAAAGGC GCGAGGCCCT CGGGTCTCTG TATATCAACG
501 ACATGCTGCT CGGAATCCTG GAAATGCTCG GCACCCATCC CCGCTCTCTC
551 TACATCGACA TCGACTGCCA CGACGGAGAC CGAGT

(B) 1  GGGCATCCGA TGAAGCCCGA CAGGCTGACA TTAACAACG CGCTTGTCTT
51  CCGGTATGGC CTGCAACAGC AGATACATCA TATATAAGAC CCACTCCTG
101 CTACACAAGC AGAAGTGGAG CCCTATCAGC ATCATGACTA CATCGAATTT
151 CTGGCCGGT ATGTATGCTT TCGTGGCGCT CTGCTCCCG AATGACATTC
201 ATACTGGCAA CGTCAGAGTC ACACCGCAGA ATCAAAACGA CATGAAGAA
251 ATGATTGACC AATTTAAGCT GCGTAGAGC TGCCCAATCT TCTCTGACAT
301 GTACGACTTC TGCAAGATGT ACGCTGGAGC ATCCTTGGCT GCTGGCGGA
351 AACTCTGGCC AGGCACTACA GATATCGCGA TCAACTGGTC AGGGGGACTA
401 CATCATGCTA AGAAGGCTGA GGCTAGTGGC TTTTGTGATG TAAATGACAT
451 CGTCCITGCA ATCCCTGCA TACTCCGGTA AACGTATCTC CTCTCGGTTT
501 GGAAGTGGT GCTTACCATA GAACAATTTG TCTAGATATC ATCCTCGGCT
551 TCTCTACATA GACATCGACA TTCACCACGG CGACGGCGT

(C) 1  GGGCATCCGA TGAAGCCCGA GCGGATGCGG ATAACCCAGC AGCTCGTCTG
51  TGCGTATGGG ATGTTGGACA AGATGCATGT CCGTGGAGC TGATGGCCTG
101 TCTTGCATTT CGCTTTCTAA ACTGACGCGA CTAGAGAGCG AACCGAGCCT
151 CCGCTGAAGA CATGACCCGC TTCCACACCG ACGAATACGT GCACTTCTCTC
201 TCGAAGGTGT CACCGGAAAC ACGAAGAGAC CTCACATATC ACGGAACAG
251 ATGTAAGCCC CTGGGGCTCT CTAGCGTCTG GACATCGGCT GACTGTATGC
301 TATCCATAT AGTTCTGGTG GCGCAGCATA ATCCAGCGTG GGATGGCTTG
351 TTGAGTTCT GCTCAATATC TCGTGGAGGG TCGATGGGTG CGTGCATCT
401 TCGATACGTC CACGCTCTCG TTACTGACCA GCATTAGAGG CGCAAGCAG
451 CCTCACGCTT GGAGCTGGCG ACATCGCAAT CAACTGGGGC GGAGGCTCTG
501 ACGACCGGAA GAAGCGGGAA GCCTCAGGGT TCTGCTAGCT TAAGGACATT
551 GTGCTCGGGA TCGTCSAGCT TCTTGGAGCG TACCGAGGGG TTCTGTACAT
601 CGACATCGAC TGCCACCACG CGACGGCGT
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequences of *hda1* (A), *hda2* (B), and *hda3* (C). Primers were underlined.

RPD3	GHPMKPHRI RMAHSLIMNYGLYKQMEIYRAKPAKQEMCGFHTDEYIDFLSRVTPONLEMFK
RPDA	GHPMKPHRI RMTHTSLVMNYSLYKQMEIYRAKPAKQEMCGFHTDEYIDFLSKVTPONDAFA
HDC1	GHPMKPQWRITHELLTAYDMLPKQIRVLRRAKRAEAVMSKFFHTDEYVHFLSRVTPENSRELT
HDA1	GHPMKPQWRITHELLTAYDMLPKQIRVLRRAKRAEAVMSKFFHTDEYVHFLSRVTPENSRELT
HDA2	GHPMKPHRLTLTVALVFGYGLDKQIHHIYDPPATQAELEDAYHDHDIIEFLGRVTPQNDQMK
HDA3	GHPMKPQWRITHELVSAYGMLDKQIHHVLRANRPAEADMTRFHTDEYVHFLSKVSPETAEDLT
HOS2	KHPMKPFRLLMIDHLVSSYGLHKIMDLVETRSATRDDELLGFHSDEYVNFLSKVSPEANAKLP
HOSA	SHPMKPHRLTLTKGLVLAGYGHAMDLVHGRAATVEELSDFFHTSDYLDLFTVPGMDNDAG
RPD3	PE —SVKFNVDGDCPVFDGLVEYCSISGGSSMEGAARLNRRGKCDVAVNAYAGLHHAKKS
RPDA	KE —OSKYNVDGDCPVFDGLVEFCGISAGSSMEGAARLNRRGKCDI AVNAYAGLHHAKKS
HDC1	YN —GYQFLVSDNPAFEGVFEFCGISAGSSVAAAORLMEGGQCDIAINWAGLHHAKKR
HDA1	YN —GYQFLVSDNPAFEGVFEFCGISAGSSVAAAORLMEGGQCDIAINWAGLHHAKKR
HDA2	NM —IDGFNCVDEDCPISDSMVDGCKMYAGASLAAARKLCAGTTDIAINWAGLHHAKKA
HDA3	YH —GTRFLVSDNPAFEGVFEFCGISAGSSVAAAORLMEGGQCDIAINWAGLHHAKKR
HOS2	RG —TLENFNIDGDCPISFQNLVYQYTYTASLDAATRKLIINQSDIAINWAGLHHAKKN
HOSA	SK DFCSENIVRFNVDGDCPISFQNLVYQYTYTASLDAATRKLIINQSDIAINWAGLHHAKKA
RPD3	EASGFCYVNDIVLGIILELLRYHFRVLYIDIDVHHGQGV
RPDA	EASGFCYVNDIVLGIILELLRFRKRWLYIDIDVHHGQGV
HDC1	EASGFCYINDIVLGIILEMLRTVPRVLYIDIDCHHGQGV
HDA1	EASGFCYINDIVLGIILEMLRTVPRVLYIDIDCHHGQGV
HDA2	EASGFCYVNDIVLAIILELLRYHFRVLYIDIDVHHGQGV
HDA3	EASGFCYVNDIVLGIILEMLRTVPRVLYIDIDCHHGQGV
HOS2	SPSGFCYVNDIVLSIILELLRYHFRVLYIDIDVHHGQGV
HOSA	EASGFCYVNDIVLAIILELLRIFRVMYIDIDVHHGQGV

Fig. 5. Comparison of amino acid sequences of HDAC fragments of *G. lucidum* with other fungal HDACs. Identical amino acids were shaded. Hyphen represented no amino acid when compared with other HDACs. RPDA and HOSA, *Aspergillus nidulans* HDACs; RPD3 and HOS2, *Saccharomyces cerevisiae* HDACs.

와 59-72%의 상동성을 보여 영지 특유의 HDAC 유전자를 4개 또는 그 이상 가지고 있다고 판단된다.

진핵세포 생물에서 유전자의 발현을 조절하는 방식은 원핵세포에 비하여 매우 다양하며, 특히 염색질의 안정성과 관련됨과 동시에 유전자의 발현에 직접적인 영향을 주는 HDAC의 기능은 많은 관심의 대상이 되고 있다. 최근 인간의 평균수명이 빠르게 증가됨에 따라 노화에 대하여 많은 연구가 수행되고 있으며 사람의 섬유아세포에서 HDAC에 속하는 HDAC1과 HSIR2가 노화의 억제 및 수명연장과 관련이 있다고 보고되었다(4). 최근 벼에서 HDAC의 cDNA를 과 발현시킨 형질전환체의 생장이 증가되는 것이 보고되었다(3). 영지는 우리나라를 포함하여 동아시아에서 오랫동안 약용으로 사용되었으나 생장이 느리고 자실체의 생성도 매우 느린 단점을 가지고 있어 이 연구가 앞으로 영지의 효율적 이용에 기여할 것으로 기대한다.

참고문헌

1. Graessle, S., M. Dangel, H. Haas, K. Mair, P. Trojer, E.-M. Brandt-

ner, J. Walton, P. Loidl, and G. Brosch. 2000. Characterization of two putative histone deacetylase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 120-126.

2. Imai, S., C. Armstrong, M. Kaerberlein, and L. Guarente. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.

3. Jang, I.C., Y.M. Pahk, S.I. Song, H.J. Kwon, B.H. Nahm, and J.K. Kim. 2003. Structure and expression of the rice class-I type histone deacetylase genes OsHDAC1-3: OsHDAC1 overexpression in transgenic plants leads growth rate and altered architecture. *Plant J.* 33, 531-541.

4. Kim, M.-M., S.-O. Yoon, Y.-S. Cho, and A.-S. Chung. 2004. Histone deacetylases, HDAC1 and HSIR2, act as a negative regulator of aging through p53 in human gingival fibroblast. *Mech. Aging Develop.* 125, 351-357.

5. Kim, S., J. Song, and H.T. Choi. 2004. Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 201-204.

6. Kim, S., Y. Leem, K. Kim, and H.T. Choi. 2001. Cloning of an acidic laccase gene (*lac2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 151-156.

7. Ko, E.-M., Y.-E. Leem, and H.T. Choi. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 89-102.

8. Leem, Y., S. Kim, I.K. Ross, and H.T. Choi. 1999. Transformation and laccase mutant isolation in *Coprinus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 35-40.

9. Lusser, A., G. Brosch, A. Loidl, H. Haas, and P. Loidl. 1997. Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* 277, 88-91.

10. Srikantha, T., L. Tsai, K. Daniels, A. Klar, and D. Soll. 2001. The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183, 4614-4625.

11. Taunton, J., C. Hassig, and S. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.

12. Ura, K., H. Kurumizaka, S. Dimitrov, G. Almouzni, and A. Wolffe. 1997. Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J.* 16, 2096-2107.

13. Wu, K., L. Tian, K. Malik, D. Brown, and B. Miki. 2000. Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 22, 19-27.

(Received June 30, 2004/Accepted July 26, 2004)

ABSTRACT : Partial Cloning of Histone Deacetylase Genes from *Ganoderma lucidum*.

Sunkyung Kim, Joohee Kum, and Hyoung T. Choi* (Department of Microbiology, Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

Histone deacetylase (HDAC) removes acetyl group in lysine residue of histone protein, which is transferred by histone acetylase. HDAC is important in the stabilization and regulation of gene expression in eukaryotic organisms. PCR has been carried out to clone HDAC genes using cDNA library and genomic DNA as the templates from *Ganoderma lucidum* isolated in Korea. One 470 bp cDNA gene fragment, and 3 genomic HDAC fragments (585 bp, 589 bp, 630 bp) were amplified. When their deduced amino acid sequences were compared with other fungal HDACs, they showed 59-72% homology.