

Pseudomonas sp. DJ77에서 Glutathione S-transferase를 암호하는 *phnC* 유전자의 염기서열과 상동성 분석

우희종 · 신명수 · 김성재 · 정용제 · 정안식¹ · 박광균² · 김영창*

충북대학교 생명과학부, ¹한국과학기술원 생물과학부, ²연세대학교 구강생물학교실

Pseudomonas sp. DJ77로부터 클로닝된 glutathione S-transferase 유전자(*phnC*)의 염기서열을 결정하였다. 603 bp의 open reading frame(ORF)이 존재하였고 개시코돈 앞에서 Shine-Dalgarno sequence를, 종결코돈 뒤에서는 terminator sequence를 발견하였다. *phnC* 유전자에서 만들어지는 PhnC 단백질은 21,416 Da으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과와 일치하였다. PhnC는 *Burkholderia cepacia* LB400, *Cycloclasticus oligotrophus* RB1의 GST와 각각 53.7%, 49%의 높은 상동성을 나타냈다. 아미노산 서열의 상동성과 필수잔기들의 존재유무로 판단할 때 PhnC GST는 theta class GSTs와 진화적으로 유연관계가 높았지만 alpha, mu, pi, sigma class GSTs에서 구조적, 기능적으로 중요하다고 알려진 아미노산 잔기들이 PhnC GST에도 보존되어 있었다. 또한, *phnC* 유전자의 위치가 *C. oligotrophus* RB1, *B. cepacia* LB400 등의 GST 유전자 위치와 유사하다는 점에서 PhnC 효소는 난분해성 방향족 탄화수소의 분해에 관여하는 것으로 생각된다.

KEY WORDS □ *Pseudomonas* sp. DJ77, *phnC* gene, Glutathione S-transferase

Glutathione S-transferases(GSTs)는 다양한 기질의 친핵성 화합물과 glutathione(GSH)의 thiol 그룹의 S-conjugation 반응을 촉매하는 효소로 독성물질의 해독과 이종생리물질(xenobiotics)의 체외 배설에 관여한다. 즉 GSTs는 살충제, 제초제, 항생제, benzo(a)pyrene과 aflatoxin B1 등의 발암물질과 다양한 환경오염물질 등에 대한 해독 및 제거작용을 하여 세포의 내성을 증가시키는 중요한 작용을 한다. 또한 최근에서 와서 암과 GSTs의 발현이 연관이 있다는 사실이 알려지면서 암의 예방, 치료의 관점에서 많은 연구가 수행되고 있다 (12, 21).

GSTs는 동종 또는 이종 이합체 단백질로 각 subunit의 분자량은 대략 25 kDa 정도이며 인간에 있어서는 총 세포성 단백질의 5%를 이루고 있다. GSTs에 대한 분류는 기질에 대한 성질, inhibitor에 대한 특성, 항체에 대한 작용 등의 생화학적 특성과 구조적 특성에 따라 alpha, mu, pi, theta, sigma와 microsomal 효소 등으로 분류하며 아미노산 서열의 상동성은 같은 종일 경우 60-80%로 매우 높은 편이지만 다른 종간에는 25-35%로 비교적 낮다(7, 13). 인간에 있어서 각 조직세포에 따라 다른 이성효소가 발현되고 있는 GSTs는 인간을 포함한 고등동물뿐 아니라 물고기, 식물, 곤충, 곰팡이, 효모 등에서도 분리되었으며(2), 근래에는 세균에서도 분리되어 거의 모든 생물종에서 발견되고 있다. 세균에 있어서 GSTs에 대한 연구는 1981년에 처음으로 대장균과 기타 세균에 GSTs활성이 있음이 알려진 이후 현재까지 *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* sp. DJ77에서 효소가 분리정제 되어졌고(3, 4, 8, 9) 여러 종류

의 세균에서 유전자의 완전한 염기서열과 아미노산 서열이 밝혀졌다(14, 20, 28, 29, 31). 그러나 세균성 GSTs의 생물학적 기능, 구조 및 조절 등에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

Phenanthrene, biphenyl, salicylate 등을 단일 탄소원으로 이용하여 생장할 수 있는 균주인 *Pseudomonas* sp. DJ77의 chromosomal DNA로부터 Kim 등(16)은 phenanthrene 분해와 관련된 유전자군을 클로닝하여 유전자군에 존재하는 *phnC* 유전자가 glutathione S-transferase의 유전자임을 밝혀냈다. 또한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동분석으로 PhnC 단백질이 재조합 플라스미드에서 과발현(overexpression)되며 효소의 subunit이 24 kDa임을 확인함으로써 세균에서는 최초로 GST 클로닝에 성공하였다. 본 연구에서는 이미 클로닝되어진 플라스미드 pPHENX7내에 존재하는 glutathione S-transferase 유전자(*phnC*)의 염기서열을 결정하여 유전자의 존재를 확인하고, 이것으로부터 다른 GSTs와의 염기서열 혹은 아미노산 서열의 상동성을 조사하여 상관관계 및 기능에 대해서 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에 사용한 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. Phenanthrene 분해 균주는 공장폐수에서 분리한 *Pseudomonas* sp. DJ77(16)이며, 형질전환을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM101과 XLI-Blue를 사용하였다. Vector로는 pBLUES-CRIP SK(+) phagemid(Stratagene Co.)를 사용하였다. 배지로는 Luria-Bertani(LB) 배지(Bactotryptone, 10 g; Bacto yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g/L, pH 7.0)를 사용하였고 고체 배지는

*To whom correspondence should be addressed

Table 1. The list of the strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Reference
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ77	Growth with phenanthrene, 4-chlorobiphenyl, and benzoate	16
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-proAB</i>	23
	F[<i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ^F <i>lacZ</i> ΔM15 Tn10 (<i>ter</i> ^R)]	
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>)	23
	F[<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ^F <i>lacZ</i> ΔM15]	
Plasmids		
pBluescript SK(+)	Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZ</i> α	
pHENX7	6.8 kb <i>Xho</i> I fragment from DJ77 inserted into SK(+)	16
pXH39	3.9 kb <i>Hind</i> III fragment of pHENX7 in SK(+)	16
pXP16	1.65 kb <i>Xho</i> I- <i>Pst</i> I fragment of pHENX7 in SK(+)	This work
pSP13	Deleted 0.3 kb <i>Sal</i> I fragment of pXP16 in SK(+)	This work
pCN682	0.6 kb <i>Cla</i> I- <i>Nar</i> I fragment of pXP16 in SK(+)	This work
pNN653	0.6 kb <i>Nar</i> I- <i>Nar</i> I fragment of pXP16 in SK(+)	This work

agar를 1.5% 첨가하여 제조하였다.

DNA 추출 및 제한효소 처리

Plasmid DNA의 추출은 Sambrook의 방법(23)을 사용하였고 DNA sequencing을 하기 위한 plasmid DNA 추출은 QIAGEN plasmid kit(Qiagen Inc.)를 사용하였다. 각종 제한효소와 T4 DNA ligase는 Boehringer Mannheim사와 Promega사로부터 구입하여 사용하였으며, 반응 조건은 제조 회사의 처방에 따랐다.

DNA 염기서열 결정

Sequenase version 2.0 kit(USB Co.)를 사용하여 dideoxy-mediated chain termination 방법(24)으로 DNA 염기서열을 결정하였다. -40 universal primer와 reverse primer는 USB 사로부터, [α -³⁵S]dATP는 New England Nuclear사로부터 구입하였다. 염기서열 결정은 DNA의 양쪽 strands를 2회 이상 실시하였다.

효소 활성의 측정

효소의 활성측정을 위한 효소액은 10⁸ cells/ml까지 배양한 세포를 4°C에서 원심분리(10,000×g, 5분)하여 회수한 후 50 mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척한 다음, 얼음속에서 30초 간격으로 15회 동안 10회 이상 sonication하고 원심분리하여 얻은 청정한 상층액을 사용하였다. 또한 40 μg/ml의 IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside)를 사용하여 효소 단백질의 대량생산을 유도하였다. 단백질의 정량

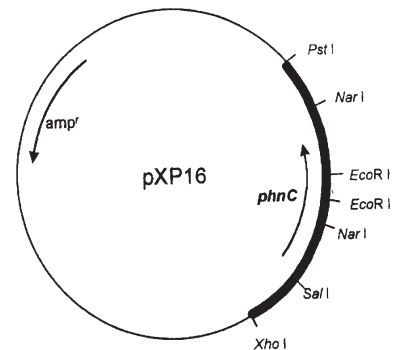


Fig. 1. Restriction map of pXP16. The DNA fragment subcloned from pHENX7 is presented on a black box. Arrowheads indicate the direction of transcription.

은 Lowry 등의 방법(10)으로 측정하였으며 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. Glutathione S-transferase의 활성은 100 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)에 1 mM glutathione과 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 기질로 첨가하여 25°C에서 반응시킨 후, 340 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다(6).

결과 및 고찰

phnC 유전자의 염기서열

Pseudomonas sp. DJ77의 chromosomal DNA로부터 6.8-kb *Xho*I 절편이 클로닝되어진 재조합 플라스미드 pHENX7의 유전자군은 *phnCDEF*의 순서로 유전자가 존재한다(16). 이러한 유전자군으로부터 *phnC* 유전자만을 포함하고 있는 재조합 플라스미드를 제조하기 위하여 pHENX7을 *Xho*I-*Pst*I의 제한효소로 절단하여 얻은 1.65-kb의 DNA 절편을 pBLUESCRIPT SK(+)에 삽입시켜 *phnC* 유전자만을 가지는 재조합 플라스미드 pXP16(Fig. 1)과 재조합 플라스미드 pXP16의 5'쪽에 존재하는 약 0.3 kb 정도의 불필요한 DNA 절편을 제거한 재조합 플라스미드 pSP13을 제조하였다.

염기서열의 결정은 *phnC* 부위를 포함하는 pXP16의 약 700 bp *Cla*I-*Nar*I 절편과 *Nar*I 절편을 pBLUESCRIPT SK(+) 벡터에 삽입시켜 제조한 pCN682와 pNN653 등의 여러 재조합 플라스미드 유도체를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 DNASIS V7.06 program(Hitachi software)을 사용하여 분석한 결과 Fig. 2에 나타낸 것과 같이 603 bp의 염기서열로 구성되어 있는 하나의 open reading frame (ORF)과 이 ORF의 개시코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)의 6 bp 앞과 뒤쪽에서 각각 ribosome binding site(RBS)인 Shine-Dalgarno sequence로 보이는 염기서열(5'-AGGAGA-3')과 terminator 구조를 이루고 있는 염기서열(5'-ATGCGCGGCGGC-N7-GCC GCCTCGCCGCAT-3')을 발견할 수 있었다. 이 ORF는 201개의 아미노산을 암호화하며 염기서열로부터 유추한 단백질의 분자량은 21,416 Da으로 Kim 등(8, 16)이 보고한 *phnC*를 가지는 재조합 플라스미드 pHENX7 등에서 만들어

CCC AAA <u>AGG AGA</u> CTA TCT ATG AAG CTG TTC ATT AGC CCT GGT GCC TGC TCG CTC GCA CCG	60
M K L F I S P G A C S L A P	14
CAT ATT GCC CTG CGC GAA ACC GGT GCG GCG TTC GAT GCG GTG AAG GTC GAT CTG GCG ACC	120
H I A L R E T G A A F D A V K V D L A T	34
CGC AAG GTA GAG ACC GGA GAC GAT TTC CTG ACG GTC AAT CCG TCA GGC AAA GTT CCT GCG	180
R K V E T G D D F L T V N P S G K V P A	54
CTG ACC CTC GAC AGT GGC GAA ACC CTG ACT GAA AAT CCT GCG ATC CTG CTC TAC ATC GCC	240
L T L D S G E T L T E N P A I L L Y I A	74
GAT CAG AAG CCA GAC GCG GCC CTG GCG CCT CGT GAT GGC ACG TTG GAG CGT TAC CGC CTG	300
D Q K P D A A L A P R D G T L E R Y R L	94
ATC AGC CGA CTG AGT TTT CTG GCG TCG GAA TTC CAC AAG GCG TTC GTA CCG CTT TTC ACA	360
I S R L S S F L G S E F H K A F V P L F T	114
CCC GGC AGC AGC GAC GAA GCA AAG CTC GCG GCC TCG ACC GCC GTC AAG AAT CAT CTG GGT	420
P G S S D E A K L A A S T A V K N H L G	134
GCG CTG GAC AAG GAA CTT TTG GAC AAG GAA CAC TAT GCC GGT TCT GAA TTC AGC GTC GCC	480
A L D K E L L D K E H Y A G S E F S V A	154
GAC ATC TAT CTG TTC GTG ATG CTG GGC TGG CCG GCC CAT GTC GGG ATC GAC ATG AGC GCC	540
D I Y L F V M L G W P A H V G I D M S A	174
TAT CCC AAC CTT GGT GCT TAT TGC GGC CGG ATC GCG CAG CGC CCG TCG GTT GGC GCA ACA	600
Y P N L G A Y C G R I A V G A C A	194
CTC AAG GCC GAA GGG CTC GTC TGA TCG GGC ATC CGC GAG GCG GCG ATT TCT GGT GCG TCG	660
L K A E G L V *	201
TCT TTA TTT GCC AAT GCG T	685

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *phnC* gene. A putative ribosome binding site is underlined and a terminator sequence is represented by dark square. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is also presented.

지는 SDS-PAGE 결과와 거의 일치하였고 G+C 함량은 60.1%로 pHENX7에 존재하는 다른 유전자인 *phnD*(60.5%, 25)와 비슷했고 *phnE*(57.4%, 15)보다는 높았다.

PhnC 단백질의 glutathione S-transferase 효소 활성

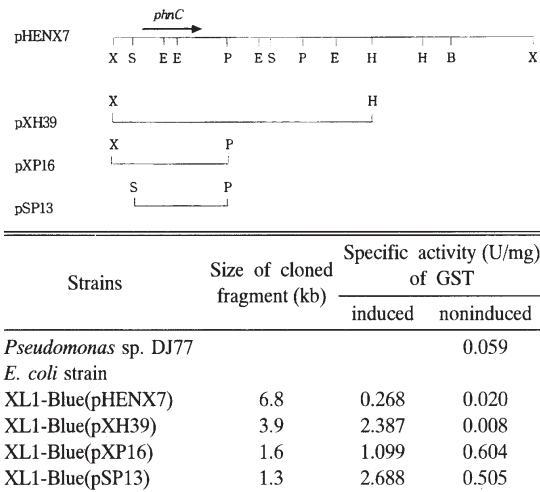
Pseudomonas sp. DJ77, pHENX7 그리고 pHENX7에서 제조한 *phnC* 유전자를 가지고 있는 재조합 플라스미드들(pXH39, pXP16, pSP13) 가지는 *E. coli* XLI-Blue에서 추출한 단백질을 가지고 GST 활성의 가장 대표적인 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)을 사용하여 효소 활성을 측정하였다(Fig. 3). *phnCDEF*의 유전자군이 존재하는 재조합 플라스미드 pHENX7을 가지는 *E. coli* 균주의 단백질보다 *phnC* 유전자만이 존재하는 재조합 플라스미드(pXP16, pSP13)를 가지는 균주에서 추출한 단백질의 GST 효소 활성이 높았으며, *E. coli* 균주의 경우 IPTG를 이용하여 재조합 플라스미드의 단백질 발현을 유도하였을 때의 GST 활성값이 단백질의 발현을 유도하지 않았을 때보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 *phnC* 유전자만이 존재하도록 제조한 pXP16, pSP13 등에 완전한 glutathione S-transferase 유전자가 존재하며 효소단백질이 이미 전보(16)에서 보고한 바와 같이 과발현된다는 것을 의미한다.

PhnC 아미노산의 상동성 비교

염기서열로부터 유추한 PhnC 효소의 아미노산 서열을 Genbank와 Swissprot data base를 이용하여 GST 아미노산 서열이 알려진 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(BphX

0), *Burkholderia cepacia* LB400(BphK), *Cyclocasticus oligotrophus* RB1(XylK), *Proteus mirabilis*(GSTB1-1), *E. coli* (GST), *Hemophilus influenzae*(BphH), *Synechocystis* sp. PCC-6803(GST), *R. leguminosarum*(GSTA) 등의 세균과 효소의 삼차구조가 밝혀진 식물(*A. thaliana*), 곤충(*L. cuprina*), 기생충(*S. japonica*), 오징어(squid digestive gland) 그리고 인간(α class class hGSTA1, μ class hGSTM, π class hGSTP1, θ class hGSTT1) GST의 아미노산 서열과 비교하여 보았다. PhnC 효소의 아미노산 서열을 다른 종의 세균성 GSTs와 비교했을 때 *B. cepacia* LB400(53.7%), *P. pseudoalcaligenes* KF707(53.2%), *C. oligotrophus* RB1(49%)의 GST와 높은 상동성을 보였으며 *E. coli*(45%), *P. mirabilis*(48%), *H. influenzae*(39%)의 효소와도 비교적 높은 상동성을 나타냈다. 그러나, 최근에 밝혀진 *R. leguminosarum*(35%), *Synechocystis* sp. PCC6803(33%)의 GST에 대한 상동성은 비교적 낮았다.

세균에 존재하는 GST 효소의 삼차구조와 다른 비세균성 GSTs와의 유연관계 및 분류에 대해 알려진 바가 없기 때문에 GST 아미노산 서열의 상동성 비교로 PhnC와 다른 종의 세균성 및 비세균성 GSTs와의 유연관계를 조사하였다. Fig. 4와 같이 PhnC 및 *B. cepacia* LB400, *E. coli*, *H. influenzae* 등에서 발견된 세균성 GSTs는 기생충 및 인간, 오징어의 α , μ , π , σ class GSTs 보다는 *Synechocystis* sp. PCC6803, *R. leguminosarum*의 세균성 GST 및 식물, 인간, 곤충에 존재하는 θ class GSTs와 아미노산 서열이 비슷했다.



*one unit of enzyme activity was defined as the amount producing 1 μ mol of conjugate of glutathione with CDNB per min at 25°C.

Fig. 3. Specific enzyme activity of *PhnC* and genetic map of recombinant plasmid pHENX7 and its derivatives (pXH39, pXP16, pSP13). The direction of transcription of the *lac* promoter is indicated as arrow heads. Abbreviations: E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I; B, *Bgl*II; X, *Xho*I.

포유동물의 GSTs에서 α , μ , π class GSTs는 공통적인 기본구조와 필수 잔기를 가지고 있으며, Dirr 등(5)은 3차 구조에 필수적인 26개의 잔기를 보고한 바 있다. 아미노산 서열이 비교적 유사하며 N-말단 Tyr이 필수적인 잔기로 알려진 인간의 α , μ , π class GST, 그리고 기생충, σ class 오징어 GST와 *PhnC*의 아미노산 서열을 분석한 결과 전체 아미노산에 대한 상동성 정도는 비교적 낮았지만 26개의 필수적인 잔기 중 12개의 잔기는 보존되어 있는 것으로 나타났다. 특히 이들 12개 잔기 중 Pro⁵³, Ile⁶⁹, Gly¹⁴⁸, Asp¹⁵⁵ 등의 잔기는 *PhnC*를 포함한 세균성 GSTs와 α , μ , π , θ , σ class GSTs에 공통적으로 보존되어 있었다. 그러나 X-선 crystallographic 분석(7, 22, 26)과 site-directed mutagenesis(11, 17, 18, 27, 30)을 통해 α , μ , π , σ class GSTs에서 효소의 활성화 및 GSH binding에 관여하는 필수적인 잔기로 밝혀진 N-말단 Tyr이 *PhnC*에 존재하지 않으며, θ class GST의 활성부위로(1, 32) 알려진 N-말단 필수잔기 Ser이 *PhnC*를 포함한 모든 종의 세균성 GST에서 보존되어져 있음은 세균성 GSTs가 α , μ , π , σ class GSTs보다 θ class GSTs와 아미노산 서열이 비슷하다는 효소의 상동성 결과와도 일치하는 것이다. 필수잔기의 일치 부분이나 전체 아미노산의 상동성을 진화적인 관점에서 생각해 볼 때 *PhnC* GST와 θ class GSTs는 공통 전구효소에서 유래하여 기능과 환경에 적합하도록 발전 진화된 것으로 추측된다.

PhnC GST 유전자의 위치와 기능

포유동물에서 항생제 등을 포함한 많은 종류의 난분해성

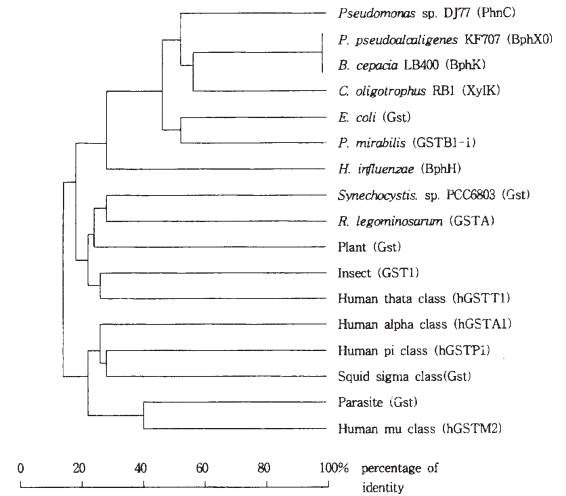


Fig. 4. Dendrogram showing the levels of homology between the amino acid sequences of different glutathione S-transferase. The sequences were obtained from the Swissprot and Genbank databases. Amino acid sequences are glutathione S-transferases from *Pseudomonas* sp. DJ77 (this work), *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Genbank accession number D85835), *B. cepacia* LB400 (Genbank accession number X76500), *C. oligotrophus* RB1 (Genbank accession number U51165), *E. coli* (Swiss-prot accession number P39100), *P. mirabilis* (Swiss-prot accession number P15214), *H. influenzae* (Swiss-prot accession number P45207), *Synechocystis* sp. PCC6803 (Genbank accession number D64001), *R. leguminosarum* (Genbank accession number X89816), Plant (*A. thaliana*, Swiss-prot accession number P42761), Insect (*L. cuprina*, Genbank accession number P42860), Parasite (*S. japonica*, Swiss-prot accession number P08515), Squid sigma class (Squid digestive gland, PDB accession number 1065021), θ class human hGSTT1 (Swiss-prot accession number P30711), α class human hGSTA1 (Swiss-prot accession number P08263), π class human hGSTP1 (Swiss-prot accession number P09211), and μ class human hGSTM2 (Swiss-prot accession number P09488).

물질과 발암물질의 해독에 관여하는 것으로 알려진 GSTs는 효소의 발현이 암과 연관이 있다는 것이 알려지면서 많은 연구가 이루어졌다. 그러나, 세균에 존재하는 GSTs의 세포 내에서의 역할에 대해서는 항생제에 대한 저항성에 관여한다는 보고(20) 외에는 알려진 바가 거의 없다. 유전자의 위치를 기능과 연관지어 생각해 볼 때 *Pseudomonas* sp. DJ77에서 GST 유전자(*phnC*)가 방향족 탄화수소 분해 관련 유전자군에서 발견된 것과 *PhnC* 효소와 가장 높은 아미노산 상동성을 가지는 GST 유전자(*P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphX0*, *B. cepacia* LB400의 *bphK*, 그리고 *C. oligotrophus* RB1의 *xykK*)가 *phnC*와 같이 방향족 탄화수소 분해 유전자군에 존재한다(27, 28, 30)는 사실은 주목할 만하다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 *C. oligotrophus* RB1의 *xykK*는 integral membrane protein 유전자(*xykM*)와 2-hydroxy-5-methyl-6-oxo-hexa-2,4-dienoate dehydrogenase 유전자(*xykG*) 사이에 위치하며 *B. cepacia* LB400와 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 GST

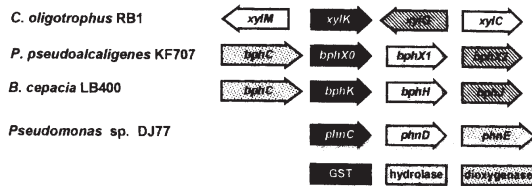


Fig. 5. Comparison of location of GST encoding gene in *Pseudomonas* sp. DJ77 and other bacterial strains. Arrows indicate the direction of transcription. Homologous genes are represented by arrows of the same type. The genes of the glutathione S-transferase (*xylC*, *bphC*, *bphK*, and *phnC*) are in black, that of hydrolase (*phnD*) is wavy, and those of dioxygenase (*bphC* and *phnE*) are dotted. The homologous hydratase gene *bphX1*, *bphH* are in gray and dehydrogenase gene *xylG*, *bphX2*, and *bphJ* are hatched. The information was compiled from references 15, 25, 26, 28.

유전자(*bphK*, *bphX0*)는 biphenyl-2,3-diol-1,2 dioxygenase 유전자(*bphC*)와 2-hydroxypenta-2,4-dienoate hydratase 유전자(*bphH*, *bphX1*) 사이에 존재한다. 이것은 *phnD* 유전자(2-hydroxy-muconic semialdehyde hydrolase)와 *phnE*(extradiol dioxygenase) 앞 부분에 존재하는 *Pseudomonas* sp. DJ77의 *phnC* 위치와 구조적으로 매우 유사한 것으로 PhnC 효소가 방향족 탄화수소의 분해 또는 운반에 관여함을 간접적으로 시사하는 것이다.

감사의 말

이 연구는 한국과학재단의 지원에 의해 수행되었으며(94-0401-11), 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Board, P.G., M. Coggan, M.C. Wilce, and M.W. Parker. 1995. Evidence for an essential serine residue in the active site of the theta class glutathione transferases. *Biochem. J.* **311**, 247-250.
- Boyer, T.D. 1989. The glutathione S-transferase: an update. *Hepatology* **9**, 486-496.
- Di Ilio, C., A. Aceto, R. Piccolomini, N. Allocati, A. Faraone, L. Cellini, G. Ravagnan, and G. Federici. 1988. Purification and characterization of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* **255**, 971-975.
- Di Ilio, C., A. Aceto, R. Piccolomini, N. Allocati, A. Faraone, T. Bucciarelli, D. Barra, and G. Federici. 1991. Purification and characterization of a novel glutathione transferase from *Serratia marcescens*. *Biochem. Biophys. Acta* **1077**, 141-146.
- Dirr, H., P. Reinemer, and R. Huber. 1994. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. *Eur. J. Biochem.* **220**, 645-661.
- Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
- Ji, X., P. Zhang, R.N. Armstrong, and G.L. Gilliland. 1992. A three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2 Å resolution. *Biochemistry* **31**, 10169-10184.
- Jung, U.H., Y.S. Cho, H.M. Seong, S.J. Kim, Y.C. Kim, and A.S. Chung. 1996. Characterization of a novel glutathione S-transferase from *Pseudomonas* sp. DJ77. *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 111-115.
- Iizuka, M., Y. Inoue, K. Murata, and A. Kimura. 1989. Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 6039-6042.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lie, S., P. Zhang, X. Ji, W.W. Johnson, G.L. Gilliland, and R.N. Armstrong. 1992. Contribution of tyrosine 6 to the catalytic mechanism of isoenzyme 3-3 of glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4296-4299.
- Mannervik, B. and U.H. Danielson. 1988. Glutathione transferase-structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem.* **23**, 283-337.
- Meyer, D.J., B. Coles, S.E. Pemble, K.S. Gilmore, G.M. Fraser, and B. Ketterer. 1991. Theta a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* **274**, 409-414.
- Nishida, M., K. Kong, H. Inoue, and K. Takahashi. 1994. Molecular cloning and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 32536-32541.
- Kim, Y.C., M.S. Shin, K.S. Youn, Y.S. Park, and U.H. Kim. 1992. Nucleotide sequence of the *phnE* gene encoding extradiol dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 8-14.
- Kim, Y.C., K.C. Youn, M.S. Shin, and H.S. Kim. 1992. Molecular cloning of a gene cluster for phenanthrene degradation from *Pseudomonas* sp. DJ77 and its expression *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 1-7.
- Kolm, R.H., G.E. Sroga, and B. Mannervik. 1992. Participation of the phenolic hydroxyl group of tyr-8 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1. *Biochem. J.* **285**, 537-540.
- Kong, K., M. Nishida, H. Inoue, and K. Takahashi. 1992. Tyrosine-7 is an essential residue for the catalytic activity of human class pi glutathione S-transferase: chemical modification and site-directed mutagenesis studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1122-1129.
- Pemble, S.E., and J.B. Taylor. 1992. An evolutionary perspective on glutathione S-transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.* **289**, 957-963.
- Perito, B., N. Allocati, E. Casalone, M. Masulli, B. Dragani, M. Polsinelli, A. Aceto, and C. Di Ilio. 1996. Molecular cloning and overexpression of a glutathione S-transferase gene from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* **318**, 157-162.
- Pickett, C. and A. Lu. 1989. Glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 743-764.
- Reinemer, P., H.W. Dirr, R. Ladenstein, R. Huber, M.

- Lo Bello, G. Federici, and M.W. Parker. 1992. Three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 214-226.
23. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
24. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463.
25. Shin, H.J., S.J. Kim, and Y.C. Kim. 1997. Sequence analysis of the *phnD* gene encoding 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase in *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 288-291.
26. Sinning, I., G.J. Kleywegt, S.W. Cowan, P. Reinemer, H.W. Dirr, R. Huber, G.L. Gilliland, R.N. Armstrong, X. Ji, P.G. Board, B. Olin, B. Mannervik, and T.A. Jones. 1993. Structure determination and refinement of human class alpha glutathione S-transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes. *J. Mol. Biol.* **232**, 192-212.
27. Stenberg, G., P. Board, and B. Mannervik. 1991. Mutation of an evolutionarily conserved tyrosine residue in the active site of a human class alpha glutathione transferase. *FEMS Lett.* **293**, 153-155.
28. Tairo, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1992. Analysis of bph operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* **267**, 4844-4853.
29. Timmis, K., B. Holfer, and S. Backhaus. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**, 9-16.
30. Wang, R.W., D.J. Newton, S.E. Huskey, B.M. McKeever, C.B. Pickett, and A.Y.H. Lu. 1992. Site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase YaYa. *J. Biol. Chem.* **267**, 19866-19871.
31. Wang, Y., P.C.K. Lau, and D.K. Button. 1996. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soli *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2169-2173.
32. Wilce, M.C.J., P.G. Board, S.C. Feil, and M.W. Parker. 1995. Crystal structure a theta-class glutathione transferase. *EMBO J.* **14**, 2133-2143.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence and Homology Analysis of *phnC* Gene Encoding Glutathione S-transferase from *Pseudomonas* sp. DJ77

Hee-Jong Woo, Myung-Soo Shin, Sungje Kim, Yong-Je Chung, An-Sik Chung¹, Kwang-Kyun Park² and Young-Chang Kim* (School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ¹Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, ²Department of Oralbiology, Yonsei University, 120-749)

The nucleotide sequence of the structural gene (*phnC*) encoding a glutathione S-transferase (*phnC*) was determined. An open reading frame of 603 base pairs, a Shine-Dalgarno sequence upstream from an initiation codon and a transcriptional terminator sequence downstream from a stop codon were found. The open reading frame encoded 201 amino acids and calculated molecular weight of the encoded protein was 21,416 Da, which was compatible with the relative molecular mass by SDS-PAGE. The deduced amino acid sequence of the PhnC protein showed 53.7% and 49% identity with GSTs of *Burkholderia cepacia* LB400 and *Cyclocasticus oligotrophus* RB1 respectively. PhnC is evolutionarily related with the theta class cytosolic GSTs based upon catalytic invariant residues and homology in the primary structure. Although the homologies of the PhnC with alpha, mu, pi, sigma class GSTs were lower than with theta class GSTs, many of the residues assigned to be important for the catalytic mechanism or the structure in cytosolic GSTs were found to be conserved in the PhnC enzyme. In addition, homology GST gene location among *P. pseudomonas* sp. DJ77, *B. cepacia* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707 and *C. oligotrophus* RB1 suggests that the PhnC GST might be involved in degradation of aromatic hydrocarbons.