Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 25, No. 4, 374-378 (1997)

Pseudomonas sp. strain DJ77에 존재하는 Glutathione S-Transferase 아미노 말단잔기의 Site-directed Mutagenesis

우희종 · 박용춘 · 김성재 · 정용제 · 정안식[1] · 김영창*
충북대학교 생명과학부, [1]한국과학기술원 생물과학부

Site-directed Mutagenesis on N-terminal Residue of Glutathione S-Transferase in *Pseudomonas* sp. Strain DJ77. Hee-Jong Woo, Yong-Chjun Park, Sungje Kim, Yong-Je Chung, An-Sik Chung[1] and Young-Chang Kim*. *School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, [1]Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea* – Glutathione S-transferase (GST) was purified from *Pseudomonas* sp. DJ77, and its N-terminal sequence was determined to be MKLFISPGACSL. A specific tyrosyl residue in the vicinity of the N terminus is conserved in all the known cytosolic GSTs and has been shown to function as a catalytic residue in α, μ, π class GSTs from mammals. However, *Pseudomonas* sp. DJ77 GST has the Phe-4 and Ile-5 instead of Tyr in N-terminus. Its replacement with tyrosine did not significantly affect the enzyme activity. Results from *in vitro* biochemical analyses were confirmed by the *in vivo* activity-based CDNB growth inhibition analyses. Our results clearly indicate that GST of *Pseudomonas* sp. DJ77 has a novel reaction mechanism different from that of mammalian GSTs.

Glutathione S-transferase(GSTs)는 약 25 kDa의 단위체가 동종(homo) 또는 이종이합체(heterodimer)로 구성되어 있는 다기능성 단백질로 환원된 상태의 glutathione(GSH)을 여러 가지 소수성, 친전자성 화합물에 전달하는 효소이다(1-3). 즉 GSTs는 독성물질을 해독하며, 이종생리물질을 체외로 배설하는 작용을 촉매한다. 또한 organic hydroperoxide를 peroxidation하여 지방산화를 방지하고 특정 물질을 운반하는 역할을 하거나, 살충제, 제초제, 항생제, benzopyrene과 aflatoxin B1 등의 발암물질, 그리고 다양한 환경오염물질 등에 대한 해독 및 제거작용을 하여 세포의 내성을 증가시키는 중요한 작용을 한다(4-6).

대부분의 세포성 GSTs는 그 아미노산 서열과 각각의 특성에 따라 적어도 alpha, mu, pi, theta와 sigma의 다섯 종류로 분류하며(2, 7), 미생물에서도 분리되었다(8-10). 그러나, 미생물에 존재하는 GST에 대한 생물학적 기능, 구조, 조절에 관해서는 거의 알려진 것이 없다.

phenanthrene, biphenyl 등의 방향족 화합물을 단일 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 *Pseudomonas* sp. strain DJ77로부터 최초로 클로닝한 세균성 GST 유전자(*phnC*)는 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)에 대해 높은 활성을 나타내는 전형적인 세균성 GST이다(11, 12). *phnC* 유전자로부터 유추한 단백질의 아미노산 서열은 고등동물의 GSTs 배열과는 많이 다르지만 중요한 아미노산 잔기는 일치하고 있다. 고등 동물의 경우 같은 그룹내의 효소 사이에서는 70-80%의 상동성을 나타내며 그룹간의 상동성은 20-30%인 것으로 알려져 있는데(2), *Proteus mirabilis, E. coli*와 PhnC GST의 아미노산 배열은 45%의 상동성을 보이며 고등생물의 GST와는 약 20%로 나타났다. 특히 PhnC GST는 고등 동물의 GSTs뿐 아니라 다른 세균성 GSTs의 아미노 말단부위에 위치하며 glutathione의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 아미노산 Tyr 잔기가 Phe으로 치환되어 있다는 점에서 매우 특이하다(Fig. 1).

이러한 결과들은 PhnC GST가 새로운 형태의 효소이며 다른 반응기작을 가질수 있는 가능성을 의미하는 것이다. 우리는 oligonucleotide-directed mutagenesis 방법을 이용하여 다른 GSTs에서 가장 전형적인 효소활성 부위로 알려진 N-말단의 tyrosyl 잔기가 치환된 것으로 생각되는 PhnC GST의 아미노산 Phe-4와 Ile-5를 Tyr으로 각각 다시 변이시킨 유전자를 제조하고 이러한 변이가 PhnC GST에 미치는 효소활성변화를 측정함으로써 PhnC GST가 적어도 포유류의 alpha, mu, pi 유형의 GST와는 다른 반응기작을 가진다는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

사용 균주 및 형질전환을 위한 숙주세포와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 배지로는 Luria-Bertani(LB)

*Corresponding author
Tel. 82-431-61-2302, Fax. 82-431-68-2538
E-mail: youngkim@cbucc.chungbuk.ac.kr
Key words: *Pseudomonas* sp. strain DJ77, Glutathione S-transferase, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)

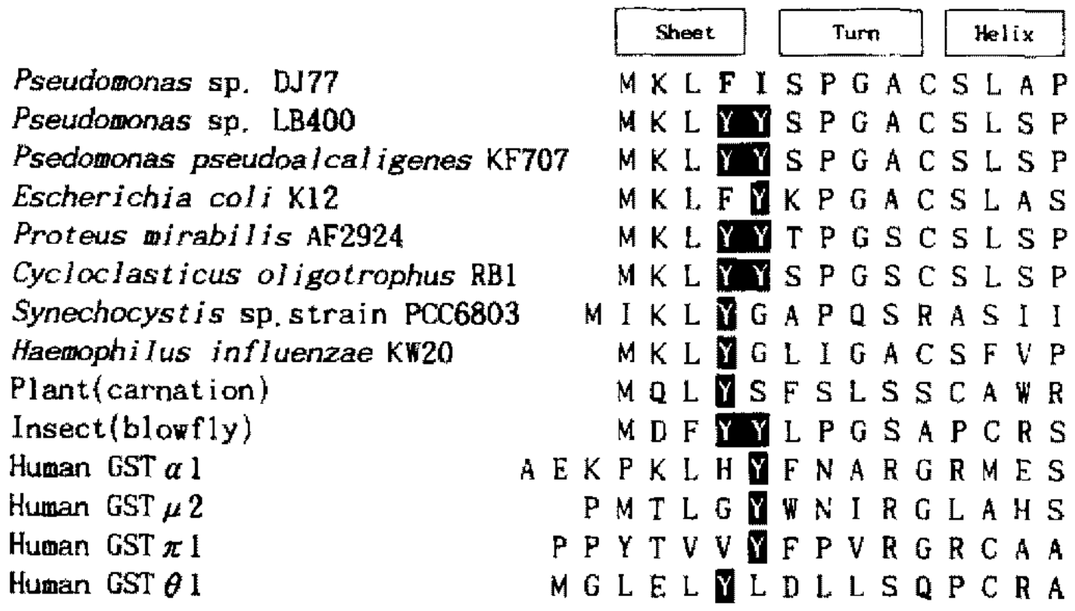


Fig. 1. Secondary structure prediction of *Pseudomonas* sp. DJ77 GST and multiple alignment of the N-terminal sequences of various glutathione S-transferases.
Pseudomonas sp. LB400 (Genbank accesion number X76500), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Genbank accession number D 85853), *Escherichia coli* (Swissprot accession number P39100), *Proteus mirabilis* (Swissprot accession number P15214), *Cycloclasticus oligotrophus* (Swissprot accession number U51165), *Synechocystis* sp. strain PCC6803 (Genbank accession number D64001), *Haemophilus influenzae* (Swissprot accession number P45207); Plant (carnation, Swissprot accession number P28342); Insect (blowfly, Swissprot accession number P42860); human GST α class (Swissprot accession number P08263), μ class (Swissprot accession number P09488), π class (Swissprot accession number P09211), θ class (Swissprot accession number P 30711).

배지를 사용하였고 고체 배지는 agar를 1.5% 첨가하여 제조하였다.

Plasmid DNA 추출 및 조작

Plasmid DNA의 추출은 Sambrook(13)등의 방법을 사용하였다. DNA sequencing을 하기 위한 plasmid DNA 추출은 QIAGEN plasmid kit(Qiagen Inc., Chatsworth. CA. U.S.A.)를 사용하였다. 각종 제한효소와 T4 DNA ligase는 Boehringer Mannheim, POSCOCHEM(남도과학)으로부터 구입하여 사용하였으며, 반응 조건은 제조회사의 처방에 따랐다.

Site-directed mutagenesis

Polymerase chain reaction에 사용할 네 종류의 oligonucleotide primer를 다음과 같이 설계하였다: primer F4Y(19 mer) 5'-ATGAAGCTGTACATTAGCCCT-3'; primer I5Y(21 mer) 5'-ATGAAGCTGTTCTAT AGCCCTGGT-3'; primer GA17(17 mer) 5'-CCAAC GTGCCATC ACGA-3'; primer SK (19 mer) 5'-GCT CTATGACTAGTGGATC-3'.

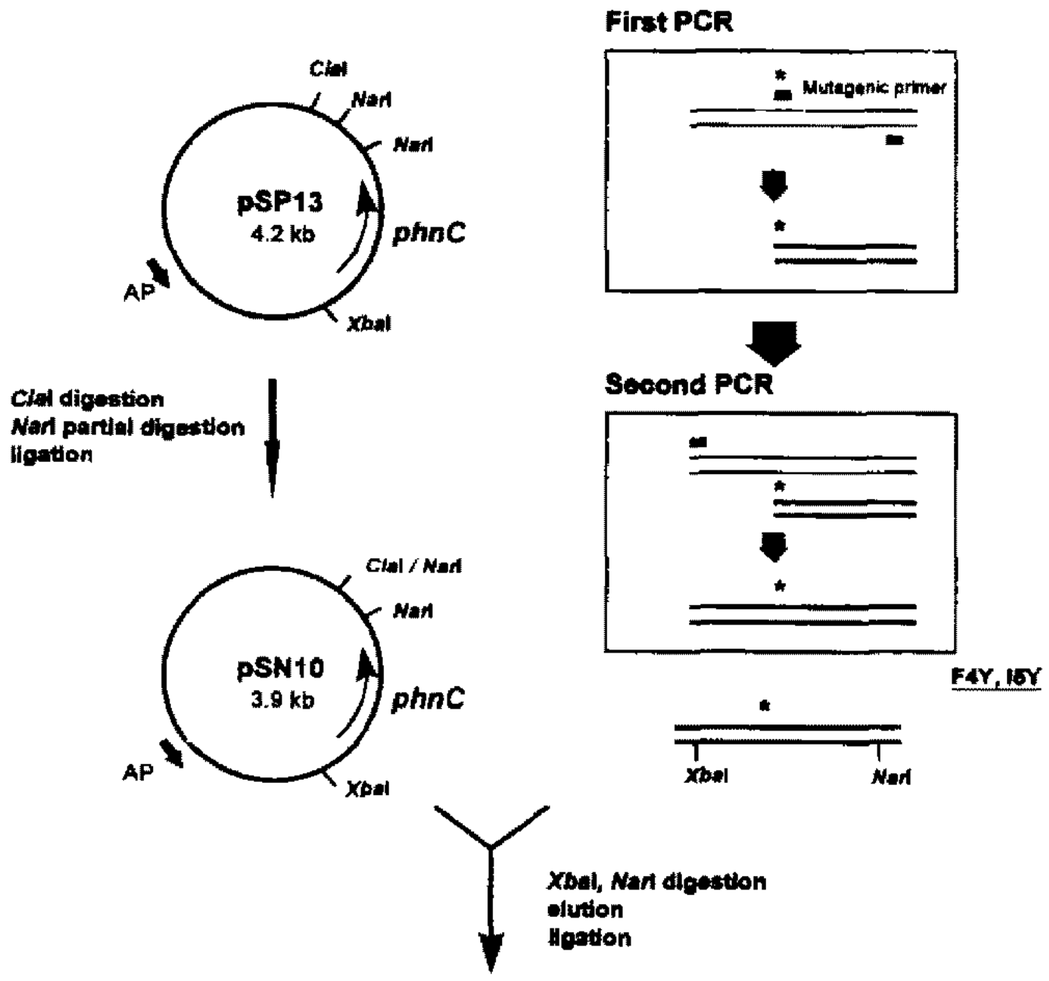
Primer F4Y와 I5Y는 Phe-4와 Ile-5를 Tyr-4, Tyr-5로 대치한 것을 제외하고는 야생주 GST와 같은 서열을 가지며 primer GA17은 야생주 GST와 역방향이 되도록 하였다. 이 primer들을 이용하여 polymerase chain reaction을 실시하여 1차 증폭시켰고 증폭된 DNA 절편들은 1% agarose gel에 전기영동시켜 분리 정제 한 뒤 SK primer와 함께 다시 polymerase chain reaction을 실시하여 2차 증폭하였다(14). 2차 증폭된 DNA 절편은 제한효소 *Xba*I, *Nar*I으로 절단해 pSN10의 *Xba*I/*Nar*I 위치에 ligation시켰다.

효소의 정제, 정량 및 활성 측정

클로닝된 GST 유전자를 가지는 균주, *E. coli* XLI-Blue를 LB 배지에 배양하여 수확하고 20 mM potassium phosphate buffer에 현탁시킨 다음 sonication하여 세포벽을 파쇄하여 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그리고 이 상층액은 GSH-affinity sepharose column을 이용하여 분리 정제하였다(12). 단백질 농도의 결정은 표준단백질로서 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford 방법(15)으로 결정하였고, 효소활성의 측정은 25℃에서 1 mM GSH와 1 mM CDNB를 기질로 사용하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에서 340 nm 흡광도 변화로 측정하였다(16).

Table 1. The list of the strains and plasmids

Strain or Plasmid	Description	Reference
Bacterial strains		
Pseudomonas sp. DJ77	Grows with phenanthrene, 4-chlorobiphenyl, and benzoate	9
E. coli XL1-Blue	*supE*44 *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*46 *thi relA1lac-proAB*) F'[*proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ*Δ M15 Tn10 (*tet*^{R})]	22
E. coli DH5α	*supE*44△lacU169(φ80*lacZ*△M15)*hsdR*17*recA*1 *endA*1*gyrA*96*thi-1recA*1	22
Plasmids		
pBluescript I SK(+)	Ap^r, mutiple cloning site in *lacZ*α	
pHENX7	6.8 kb *Xho*I fragment from DJ77 inserted into SK(+)	9
pSP13	1.3 kb *Sal*I-*Pst*I fragment of pHENX7 in SK(+)	9
pSN10	1.0 kb *Sal*I-*Nar*I fragment of pSP13 in SK(+)	This work
pSN10F4Y	Substitution mutant of pSN10 (Phe4 → Tyr4)	This work
pSN10I5Y	Substitution mutant of pSN10 (Ile5 → Tyr4)	This work



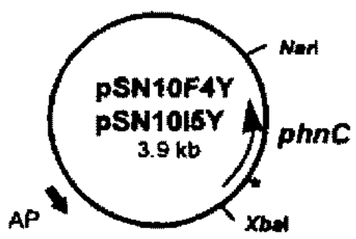


Fig. 2. Procedure for site-directed mutagenesis and construction of recombinant plasmids, pSN10, pSN10F4Y, and pSN10I5Y.
Asterisks indicate the position of mutated base pairs.

CDNB 함유 배지에서의 plating efficiency 측정

Plating efficiency는 *E. coli* XLI-Blue, *E. coli* DH5α를 숙주로 사용하여 각각 20, 40 μg/ml 및 15, 30 μg/ml의 CDNB가 함유된 항생제 LB 배지에서 32시간 배양 후 측정하였다(17, 18).

결과 및 고찰

재조합 plasmid pSN10의 제조

한 개의 mutagenic oligonucleotide를 이용하여 증폭된 돌연변이 유전자를 야생형 유전자와 쉽게 치환할수 있도록 재조합 plasmid pSN10을 제조하였다. 재조합 플라스미드 pSP13을 제한효소 *Cla*I을 처리해 절단한 뒤 *Nar*I으로 부분 절단하고 *Cla*I/*Nar*I self ligation하여 약 0.3 kb의 DNA절편을 제거하여 재조합 plasmid pSN10을 제조하였다. plasmid pSN10이 원하는 대로 정확히 만들어졌는가를 확인하기 위하여 여러 제한 효소로 절단하고 agarose gel에서 전기영동으로 분석한 결과(Fig. 3A의 3번, 4 번 lane)로 실제로 나타나는 크기가 pSP13과 비교해 예상되는 것들과 일치함을 확인하였다.

Site-directed mutagenesis

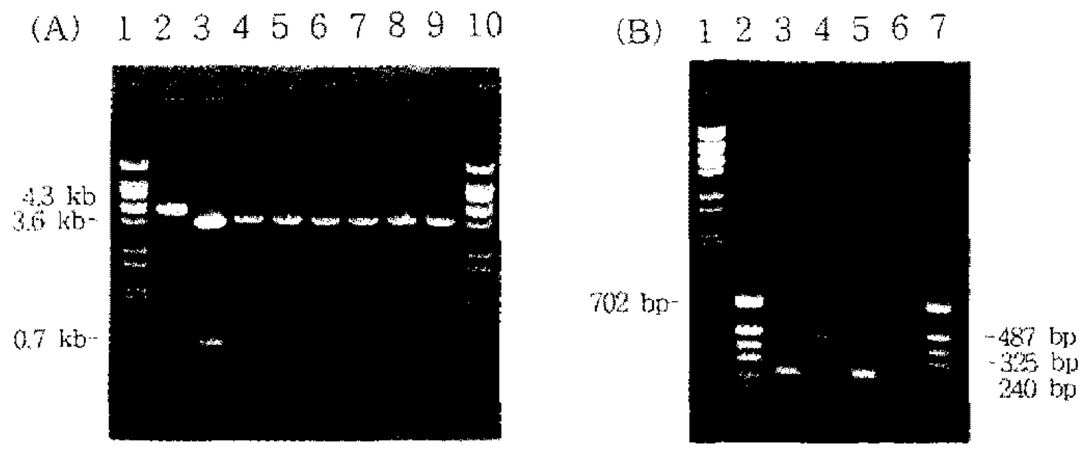


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic analysis of recombinant plasmids (A) and PCR products (B).
(A) Plasmids were digested with several restriction enzymes and subjected to 0.7% agarose gel electrophoresis. lane 1, 10, λ-*Bst*EII digest; 2, pSP13-*Xba*I; 3, pSP13-*Nar*I; 4, pSN10-*Xba*I; 5, pSN10-*Nar*I; 6, pSN10F4Y-*Xba*I; 7, pSN10F4Y-*Nar*I; 8, pSN 10I5Y-*Xba*I; 9, pSN10I5Y-*Nar*I. (B) The PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. Lane 1, λ-*Bst*EII digest; 2, 7, SK(+)-*Msp*I digest; 3, first PCR product (F4Y); 4, secondary PCR product (F4Y); 5, first PCR product (I5Y); 6, secondary PCR product (I5Y).

Mutagenesis는 두 단계의 PCR로 수행하였다. 첫 단계에서 5'-mutagenic primer(primer F4Y, primer I5Y)와 3'-universal primer(primer GA17)로 돌연변이 DNA 절편(F4Y, I5Y)을 만들었다(Fig. 3B의 lane 3, 5). 이 증폭된 DNA 생성물은 두 번째 PCR에서 남아있는 primer GA17으로 야생형의 DNA 절편이 만들어지는 것을 피하기 위하여 정제하였다. 이 정제된 이중가닥을 다시 3'-mutagenic primer와 5'-universal primer(primer SK)를 함께 이용하여 pSP13를 주형으로 2차 PCR 생성물을 얻을 수 있었다(Fig. 3B의 lane 4, 6). 2차 PCR DNA 절편은 제한효소 *Xba*I, *Nar*I을 처리해 절단한 후 재조합 plasmid pSN10의 *Xba*I/*Nar*I 부위에 삽입시켜 돌연변이주 GST유전자를 가지는 plasmid pSN10F4Y, pSN10I5Y를 제조하였다. 이렇게 얻은 plasmid pSN10F4Y와 pSN10I5Y를 기초과학 지원 센터에 의뢰한 염기서열 분석 결과 성공적인 mutagenesis가 수행되었음을 확인하였다.

효소활성 측정

*E. coli*에서 만들어진 돌연변이주 단백질을 GSH-affinity Sepharose column으로 정제하여 효소 활성을 측정하였다. 돌연변이 GST-F4Y의 CDNB에 대한 specific activity는 9.93 μmol/min/mg로 야생형 GST와 비슷한 활성을 나타내었고 돌연변이 GST-I5Y의 CDNB에 대한 specific activity는 8.97 μmol/min/mg로 야생주 GST보다 낮은 활성을 나타내었다(Table 2).

CDNB 함유 배지에서의 plating efficiency

*E. coli*에서 활성이 있는 GST가 발현되면 CDNB에 의해 성장에 저해를 받는다. 이런 성질을 이용하여 CDNB

Table 2. Specific activity of wild type and mutant enzymes for GSH-CDNB conjugation

Enzyme	Specific activity (μmole/min/mg)
Wild type	9.99
F4Y	9.93

*One unit of enzyme produces 1 μmol of S-(2,4-dinitrophenyl) glutathione per min at 25℃.

가 존재하는 배지에서 plating efficiency를 측정함으로써 생체내에서 CDNB에 대한 GST의 conjugation 활성 정도를 알 수 있다. 즉 CDNB가 함유된 배지에서 GST의 활성이 높을수록 *E. coli*의 plating efficiency는 낮아진다 (17, 18). Table 3과 같이 *E. coli* DH5α를 host로 사용하여 15 μg/ml와 30 μg/ml의 CDNB가 존재하는 배지에서의 plating efficiency를 측정한 결과, 야생형 유전자인 pSP13, pSN10 plasmid를 갖고 있는 균주는 plasmid SK(+)를 갖고 있는 균주보다 10^{-5}정도 낮은 결과를 나타내었고, pSN10F4Y를 갖고 있는 균주는 야생형 유전자를 갖고 있는 균주와 비교해 비슷하였으며 pSN10I5Y를 갖고 있는 균주는 약간 높았다. 그리고 Table 4에서 보는 바와 같이 *E. coli* XLI-Blue를 숙주로 사용하였을 경우에는 plating efficiency가 *E. coli* DH5α를 숙주로 이용했을 때보다 10^{4}정도 높았지만 plasmid SK(+)를 가진 균주에 비교해 pSP13, pSN10, pSN10F4Y, pSN10I5Y를 가진 균주는 낮았으며 돌연변이형 plasmid pSN10F4Y, pSN 10I5Y를 갖고 있는 균주는 야생형 유전자 pSP13, pSN 10를 갖고 있는 균주보다 약간 높았다. 이러한 결과는 CDNB에 대한 돌연변이 GST의 conjugation 활성 정도가 크게 변하지 않는다는 것을 의미하며 효소활성 측정 결과와도 일치하는 것으로 PhnC GST가 아미노 말단의 tyrosyl 잔기가 효소활성부위라고 알려진 α, μ, π 유형의 GSTs(19-21)와는 다른 형태의 효소이며 다른 반응 기작을 가지고 있음을 의미한다. 그러나, 효소를 정제하는 동안 GSH affinity column에 의해 정제되는 GST 단백질의 양이 야생주와 비교해 매우 큰 차이를 보였는데, 이는 이 부분이 GSH의 결합력에 어느정도 영향을 준다는 것을 시사하며 현재 진행되고 있는 *Pseudomonas* sp. DJ77

Table 3. Relative plating efficiency for *E. coli* DH5α expressing wild type GST and its mutants in the presence and absence of CDNB

Plasmid	GST expressed	Plating efficiency (+CDNB/-CDNB)	
		CDNB (15 μg/ml)	CDNB (30 μg/ml)
SK(+)	None	0.79	0.74
pSP13	Wild type GST	7.69×10^{-6}	8.79×10^{-6}
pSN10	Wild type GST	1.48×10^{-5}	2.37×10^{-5}
pSN10F4Y	Mutant GST-F	2.02×10^{-5}	1.29×10^{-5}

Table 4. Relative plating efficiency for *E. coli* XLI-Blue expressing wild type GST and its mutants in the presence and absence of CDNB

Plasmid	GST expressed	Plating efficiency (+CDNB/-CDNB)	
		CDNB (20 μg/ml)	CDNB (40 μg/ml)
SK(+)	None	0.66	1.14
pSP13	Wild type GST	1.08×10^{-1}	4.90×10^{-1}
pSN10	Wild type GST	1.43×10^{-1}	2.37×10^{-1}
pSN10F4Y	Mutant GST-F4Y	3.24×10^{-1}	4.96×10^{-1}
pSN10I5Y	Mutant GST-I5Y	4.42×10^{-1}	5.77×10^{-1}

GST의 삼차원 결정구조를 밝히는 것이 명확한 반응기작을 이해하는데 중요한 자료를 제공하리라 예상된다.

요 약

Pseudomonas sp. DJ77로부터 분리된 glutathione S-transferase(GST)의 N-말단 아미노산 서열은 MKLF ISPGACSL로 전체 아미노산 서열의 상동성은 *E. coli*와는 45%, *Haemophilus influenzae*와는 20%로 알려져 있다. N-말단의 tyrosine 잔기는 박테리아 뿐 아니라 알려진 모든 세포성 GSTs에 존재하며 포유동물의 α, μ, π 유형의 GSTs에서는 기능적인 활성자리라고 알려져 있다. 이런 점 때문에 *Pseudomonas* sp. DJ77의 GST에서 N-말단에 tyrosine 대신에 Phe-4와 Ile-5가 존재하는 것은 매우 특이한 일이다. *Pseudomonas* sp. DJ77 GST의 반응기작을 이해하기 위한 한 방법으로 site-directed mutagenesis를 이용하여 이 두 아미노산들을 각각 tyrosine으로 바꾸었다. 이 두 돌연변이주의 CDNB에 대한 효소 활성은 야생형와 비교해 거의 비슷한 활성을 나타내었고 *in vivo*에서의 CDNB에 의한 성장 저해 분석을 통해서도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과들은 *Pseudomonas* sp. DJ77 GST가 적어도 포유류의 GST와는 다른 반응기작을 가진다는 것을 의미하는 것이다.

감사의 말

이 연구는 한국과학재단(94-0401-11) 및 환경부와 과학기술처의 지원에 의한 환경공학기술 개발사업(G-7 project)의 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Mannervik, B. 1985. The isozymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Reiat. Areas Mol. Biol.* **57**: 357-417.
2. Mannervik, B. and U. H. Danielson. 1988. Glutathione transferase-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev.*

Biochem. **23**: 283-337.
3. Pickett, C. and A. Lu. 1989. Glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 743-764.
4. Armstrong, R. N. 1994. Glutathione S-transferases: Structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. *Adv. Enzymol.* **69**: 1-44.
5. Hayes, J. D., T. J. Mantle and C. B. Pickett. 1990. Glutathione S-transferase and drug resistance. Tayor and Francis. London.
6. Tew, K. D., C. B. Pickett T. J. Mantle, B. Mannervik and J. D. Hayes. 1993. Structure and function of glutathione S-transferase. CRC press, Inc., Boca Raton, F. L.
7. Morgenstern, R., J. De Jong, H. Jornvall, J. De Pierre and C. Tu. 1988. Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **263**: 8430-8436.
8. Arca, P., P. Garcia, C. Hardisson and J. E. Suaren. 1990. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. *FEBS Letters* **263**: 77-79.
9. Di Ilio, C., A. Aceto, R. Piccolomini, N. Aollcati, A. M. Caccuri, D. Barra and G. Federici. 1989. N-terminal region of *Proteus mirabilis* glutathione transferase is not homologous to mammalian and plant glutathione transferase. *FEBS Letters* **250**: 57-59.
10. 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.
11. 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 in *Escherichia coli. Kor. J. Microbiol.* **30**: 1-7.
12. Jung, Uhee, 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.
13. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
14. Olfert, L. H., P., Grunert and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis by using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**: 125-128.
15. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
16. Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **240**: 7130-7139.
17. Lee, H. C. and C. D. Tu. 1995. *Drosophila* glutathione S-transferase D: 27 functional nalysis of two consecutive tyrosines near the N-terminus. *Biochem. and Biophy. Research Comm.* **209**: 327-334.
18. Lee, H. C., Y. S. Toung, Y. L. Tu and C. D. Tu. 1995. A molecular genetic approach for the identification of essential residue in human glutathione S-transferase function in *Escherichia coli. J. Bio. Chem.* **270**: 99-109.
19. Kolm, R. H., G. E. Sroga and B. Mannervir. 1992. Participation of the phenolic hydroxyl group of Tyr-8 in the catalytic mechanism of isoenzyme human glutathione S-transferase P1-1. *Biochem. J.* **285**: 537-540.
20. Lie, S., P. Zhang, X. Ji. W. Johnson, G. Gilliland and R. Armstrong. 1992. Contribution of tyrosine 6 to the catalytic mechanism of isoenzyme 3-3 of glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 4296-4299.
21. Stenberg, G., 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. *FEBS Letters* **293**: 153-155.

(Received 19 March 1997)