

Sphingomonas chungbukensis DJ77의 16S rRNA 염기서열과 이차구조

이관영 · 권해룡 · 이원호 · 김영창^{1*}

충북대학교 자연과학대학 생명과학부

¹충북대학교 바이오 연구소

S. chungbukensis DJ77로부터 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 총 1,502 bp로 2000 년에 등록된 부분 서열(1,435 bp)보다 5' 방향과 3' 방향으로 29 bp와 37 bp 길이만큼 각각 확장하였으며, 1 bp가 추가로 삽입되었다. *E. coli*의 16S rRNA 유전자를 모델로 이차구조를 제작하였으며, 네 부위가 특이적임을 발견하였다. *Sphingomonas* spp.의 16S rRNA 서열과 *S. chungbukensis* DJ77의 다중서열검색 결과, *Sphingomonas* 종에서만 나타나는 보존부위와 가변부위를 발견할 수 있었다. 특히, *Campylobacter jejuni*에서만 나타나는 것으로 알려진 긴 stem loop 구조가 서열은 조금 다르지만 구조적 일치성을 보이는 유사한 구조를 *S. chungbukensis* DJ77에서도 발견하였다. 결과적으로, 다중서열검색을 통해 제작한 계통수와 nucleotide signatures 분석에 근거하여 *S. chungbukensis* DJ77을 cluster II (*Sphingobium*)로 분류하였다.

Keywords □ 16S rRNA, secondary structure, *Sphingomonas chungbukensis*

서 론

세균을 종 수준으로 구분짓기 위해서 주로 사용하는 분자 생물학적 방법은 16S rRNA 유전자의 염기서열 해독이다(9). rRNA는 세포 내에 많은 양이 존재하기 때문에 관찰이 쉽다는 장점을 가지며, 특히 16S rRNA와 23S rRNA는 진화적으로 변이가 매우 적은 서열이기 때문이다(16). 비교적 긴 서열을 가진 23S rRNA보다는 적절한 길이의 16S rRNA 유전자의 서열이 더 일반적으로 종 분류의 연구에 사용된다. 해독된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 계통분류학적 분석을 통해 미생물간의 종, 속 관계의 파악에 매우 유용하게 사용되며, 이를 응용한 연구도 진행되고 있다(4, 12). 특히, 16S rRNA 유전자 중에서 특정 분류군에만 존재하는 가변부위(variable region)는 종과 속간의 다양성을 발견하는 근거가 되며, 관련 연구에 응용될 수 있다(2). 또한, 진화적으로 속도가 매우 느린 부위(constant region)도 보유하고 있어 많은 생물체의 공통된 보존 염기서열과 이차구조로부터 다양한 분류군의 상호비교가 가능하다.

본 연구에 사용하는 *Sphingomonas* 속은 2001 년 Takuchi 그룹(14)에 의해, *Sphingomonas* (cluster I), *Sphingobium* (cluster II), *Novosphingobium* (cluster III), *Sphingopyxis*(cluster IV)로 재분류하는 것이 제안되었다. 이러한 분류에는 *Sphingomonas* spp.의 16S rRNA의 계통수, nucleotide signatures, 세포내 지방산의 구성, 스펙고지질의 2-hydroxy fatty acid 구성, polyamine의 세포내 농도, 분해 물질의 종류 등의 항목이 사용되었다.

본 연구에서는 다양한 polyaromatic hydrocarbon들에 대한 분해능을 암호화하는 *phm* 유전자(5, 7)를 가진 *S. chungbukensis* DJ77(6, 8)을 이용하여 유전체 프로젝트로부터 획득한 16S rRNA 서열을 근거로 계통분류학적 분류를 실시하고자 하였다. 이미 2000 년에 부분 서열로 등록했던 *S. chungbukensis* DJ77의 16S rRNA 유전자 서열(AF159257)을 완성하고, 생물정보학적 차원에서 다른 종과의 다중서열비교를 통해 종 특이적인 가변부위와 보존부위를 분석하고, 종간의 유연관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

S. chungbukensis DJ77의 16S rRNA 유전자 서열

S. chungbukensis DJ77을 *Pseudomonas* 속으로부터 *Sphingomonas* 속으로 재분류시킨 16S rRNA 유전자 서열(AF159257)을 사용하였다. 또한, *S. chungbukensis* DJ77에 대한 유전체 프로젝트를 통해 제작한 random 클론으로부터 얻었던 단편들을 조립하여 16S rRNA 유전자의 전체서열(AY911412)을 획득하였다.

염기서열과 이차구조의 생물정보학적 분석

염기서열은 뉴클레오티드 사이의 서열 유사도를 평가하는 프로그램인 BLASTN(1)을 이용하여 분석하였으며, 기존의 등록된 서열과 비교하기 위해 BLAST2(1)를 사용하였다. 더불어 ribosomal database project (RDP)의 CHECK CHIMERA 프로그램(10)을 통해 chimera artifact를 확인하였다. 다른 종의 16S rRNA 유전자들에 대한 다중서열검색은 CLUSTALX(15)로 수행하였다. 다중서열검색을 통한 계통수 제작에는 PHYLIP(13)을 이용하였고, evolutionary distance matrices는 Jukes and Cantor 모

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2302, Fax: 82-43-268-2538
E-mail: youngkim@chungbuk.ac.kr

델로 계산하였으며, 계통수는 neighbor-joining 방법으로 제작하였다. 계통수의 안정성 검사를 위해 1000 번의 bootstrap resampling을 시행하였다. 16S rRNA 유전자의 이차구조는 *E. coli*의 16S rRNA 유전자 이차구조 모델을 기반으로 하였으며(3), 이를 자동화하기 위해 RNAstructure (v. 4.11) 프로그램(11)을 사용하였다.

결과 및 고찰

16S rRNA 유전자의 염기서열 분석과 계통수 제작

S. chungbukensis DJ77의 유전체 프로젝트로부터 획득한 16S rRNA 유전자(AF911412)의 길이는 1,502 bp이다(Fig. 1). 이는 2000년도에 GenBank에 등록되었던 동일균주의 부분적인 16S rRNA 유전자(AF159257)와 BLAST2를 사용하여 비교한 결과, 67 bp 차이를 보였다. 세부적으로 살펴보면, 재발굴한 16S rRNA 유전자는 GenBank에 등록된 서열보다 5' 방향으로 29 bp, 3' 방향으로 37 bp의 길이로 각각 확장되어 있으며, 1458 번째 위치에 T 염기가 추가되었다.

2001년, Takuchi 그룹(14)에 의해 보고된 *Sphingomonas* 종의 분류에서 *S. chungbukensis* DJ77은 *S. chlorophenolica*, *S. yanoikuyae* 등과 함께 cluster II로 구분되었다. 이 시기에 사용된 *S. chungbukensis* DJ77의 16S rRNA 유전자 서열은 부분적이었기 때문에, 본 연구에서 유전체 프로젝트를 통해 완성한 서열을 가지고 서로 다른 *Sphingomonas* 종의 유전자들을 수집하여

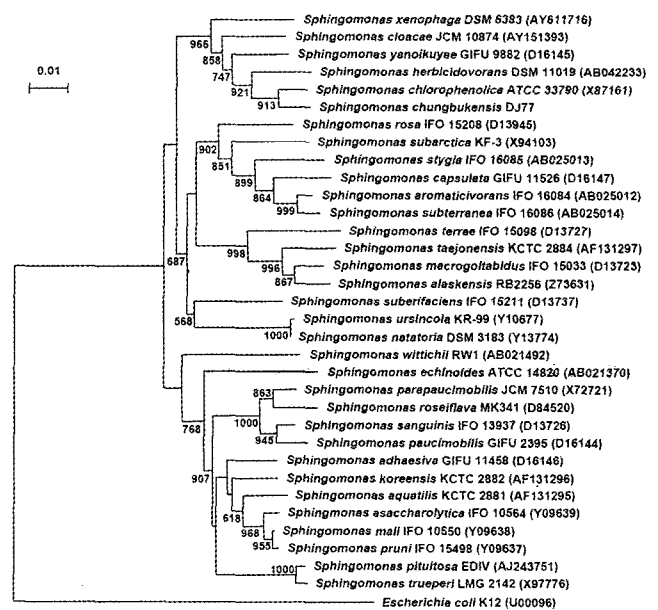


Fig. 2. Phylogenetic analysis of 16S rRNA from *S. chungbukensis* DJ77.

다중서열검색을 실시하였다. PHYLIP을 이용한 다중서열 검색 결과로부터 계통수를 제작하였다(Fig. 2). *E. coli*의 16S rRNA 유전자를 outgroup으로 선택하여 *S. chungbukensis* DJ77의 16S rRNA 유전자를 비교한 결과, *S. chlorophenolica*, *S. yanoikuyae* 등과 함께 그룹을 이루는 것으로 드러났으며, nucleotide signatures의 검색 결과, 52:359(U:A), 134(G), 593(U), 987:1218(A:U), 990:1215(U:G) 위치의 서열이 정확히 cluster II 그룹과 일치했다. 이로써 *S. chungbukensis* DJ77은 *Sphingomonas* 속의 네 그룹 중에서 cluster II (Sphingobium)로 분류됨을 확인하였다.

16S rRNA 유전자의 이차구조 분석

RNAstructure(v. 4.11) 프로그램을 사용하여 *S. chungbukensis* DJ77의 16S rRNA 유전자의 염기서열로부터 이차구조를 예측하였다(Fig. 3). 동정된 16S rRNA 유전자의 이차구조는 *E. coli* 모델과 같이 크게 5' 도메인과 중앙 도메인, 그리고 3' 도메인으로 나뉘며, 전반적으로 구조적 유사성을 가지지만 일부에서 특이적인 구조도 나타냈다. 이차구조의 네 지역에서 구조적 차이를 보이는 것은 서로 다른 속에서 동정된 유전자이기 때문이며, 이는 속 특이적인 요소를 나타내는 정보로 활용될 수 있다(Table 1).

서로 다른 *Sphingomonas* 종과 *S. chungbukensis* DJ77에서 16S rRNA 유전자에 대한 다중서열검색의 결과를 통해 보존 부

Table 1. Genus-specific regions in *S. chungbukensis* DJ77 16S rRNA

No.	Name	Position (bp)	Size (bp)
1	X1	70- 83	14
2	X2	170-185	16
3	X3	195-198	4
4	X4	433-436	4

```

CAAACCTGAGAGTTTGATCTCGGCTCAGACGAACCGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCA 60
AGTCGAACGAGACCTTCGGGTCTAGTGGCCACGGGTGCGCTAACCGTGGGAATCTGCC 120
TTGGGTTTCGGAATAACGTTTGAAACGAACGCTAATACCGGATGATGACGCCAAGAGAT 180
TTGGAGTCCAAAGATTATTCGCCAAGGATGAGCCCGGTAGGATTAGCTAGTTGGTAAG 240
GTAAGGCTTACCAAGGCGACGATCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGG 300
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATGGACAATGGGG 360
GCAACCCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGAGTGAAGGCGCTTAGGGTTGTAAGACTCTTT 420
TACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG 480
CCCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCTAG 540
GCGCGGATTTAAGTCAGGGGTGAAAGCCAGTGCCTCAACACTGGAACCTGCCCTTGAGACT 600
GGATTGCTTGAATCACGGAGAGGTGGGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA 660
TATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCACTGACCTGTATTGACGCTGAGGTGC 720
GAAACCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGGTAACAGATGATA 780
ACTAGCTGCTGGGTCATGGCATTTCCAGTGGCGAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCT 840
GGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTG 900
GAGCATGTGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACGTTTGACATCCCTATC 960
GCGGTTACCAGAGATGGTTTCTCTCAGTTCGGCTGGATAGGTGACAGGTGCTGCATGGCT 1020
GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCT 1080
TTAGTTGCCATCATTTAGTTGGTACTCTAAAGGAACCCCGGTGATAAGCCGGAGGAAG 1140
GTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTACCGGTTGGGCTACACACCGTGTCAATG 1200
GCGACTACAGTGGGAGCCACTCCGCGAGGAGGAGCTAATCTCCAAAAGCTGCTCAGTT 1260
CGGATGTTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG 1320
ATGCCGCGGTGAATACGTTCCACGGCTGTATACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTG 1380
GATTCACCTCGAAGGCGTTGAGCTAACCCGCAAGGGAGGACCGGACCCACAGTGGGTTAG 1440
CGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCT 1500
TT 1502
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of 16S rRNA from *S. chungbukensis* DJ77.

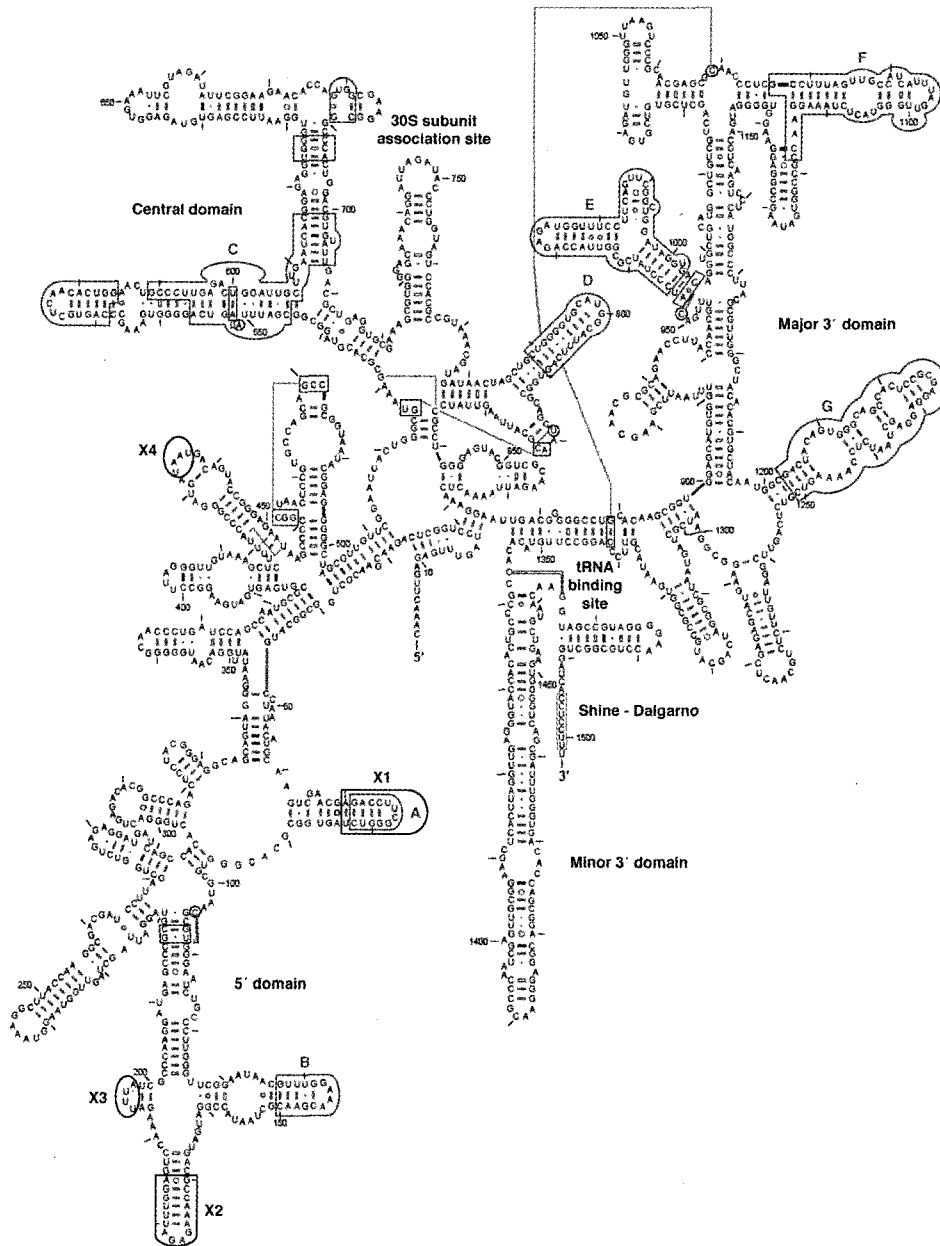


Fig. 3. Secondary structure of 16S rRNA from *S. chungbukensis* DJ77 based on that of *E. coli*.

위와 가변 부위를 분석하였다. 동일한 *Sphingomonas* 속 뿐 아니라 이차구조의 모델로 사용했던 *E. coli*에서조차 대부분(87%)의 유전자 서열은 보존적이었다. 그러나, 비보존 서열로 이루어진 A부터 G까지의 일곱 구역을 *Sphingomonas* 속의 가변 부위로 평가하였다(Table 2). 이 중, F와 G 지역은 비교적 보존 부위가 풍부하나, 나머지 A부터 E까지의 다섯 구역에서는 서열간의 강한 다양성을 관찰하였다. 주목할 만한 것은 다른 *Sphingomonas* 종에는 존재하지 않는 16 bp의 서열이 *S. chungbukensis* DJ77에서 16S rRNA의 X2 지역을 구조화한다는 사실이었다. 이 부위는 한국에서 분리된 *Sphingomonas* sp. KH3-2 (AF282616) 균주와 미국에서 분리된 uncultured soil bacterium clone PHE7d9 (AY

Table 2. Variable regions in *S. chungbukensis* DJ77 16S rRNA

No.	Name	Position(bp)	Size(bp)	Strength
1	A	71- 82	12	strong
2	B	137- 150	14	strong
3	C	545- 707	163	strong
4	D	789- 809	21	strong
5	E	954-1003	50	strong
6	F	1077-1118	42	weak
7	G	1203-1251	49	weak

699586)에서 모두 나타나지만, 같은 종으로 동정된 벨기에의 *S. chungbukensis* VM0440 (AY151392)에서는 나타나지 않는 특이

DJ77	161	GCTAATACCGGATGATGACGCCAAAGAGATTTGGAGTCCAAGATTT	207
PHE7d9	133	GCTAATACCGGATGATGACGCCAAAGAGATTTGGAGTCCAAGATTT	179
KH3-2	155	GCTAATACCGGATGATGACGCCAAAGAAATTTGGAGTCCAAGATTT	201
VM0440	142	GCTAATACCGGATGATGACCT-----GAGTCCAAGATTT	177

Fig. 4. Nucleotide sequence comparison of the X2 region. The X2 region of 16S rRNA of *S. chungbukensis* DJ77 (AY911412) is compared with that of uncultured soil bacterium clone PHE7d9 (AY699586), *Sphingomonas* sp. KH3-2 (AF282616) and *S. chungbukensis* VM0440 (AY151392).

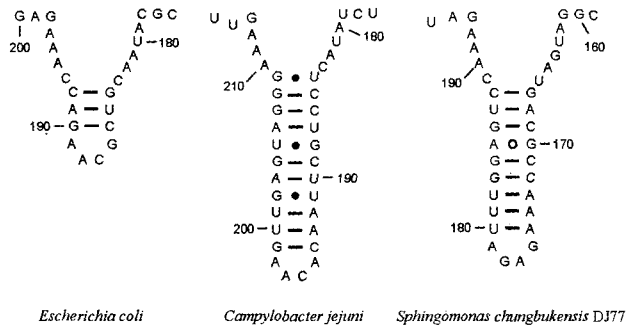


Fig. 5. Secondary structures of three species about X2 region. Sequence of *S. chungbukensis* DJ77 is different from that of *C. jejuni*, but structure of X2 region in strain DJ77 is similar to that of *C. jejuni*.

함을 보였다(Fig. 4). 또한, proteobacteria 수준에서 분석한 결과, X2와 서열은 다르지만, 구조적으로 유사한 stem loop 구조를 *Campylobacter jejuni*에서 발견하였다(Fig. 5). X2 서열은 다른 *Sphingomonas* 종에서 발견되지 않은 것으로 보아 세대를 거쳐 삽입되었을 가능성이 있으나, 지역적으로 먼 위치(한국, 미국, 벨기에)에서 동정된 유전자들 사이의 구조적 불일치는 16S rRNA 유전자 서열로 계통을 동정하는데 대한 한계를 보여준다. 앞으로 다양한 접근을 통해 *Sphingomonas* 종간의 유연관계를 밝히는 연구를 진행하고자 한다.

감사의 말

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60, 360-365.
- Cannone, J.J. S. Subramanian. M.N. Schnare. J.R. Collett. L.M.

- D'Souza, Y. Du, B. Feng, N. Lin, L.V. Madabusi, K.M. Muller, N. Pande, Z. Shang, N. Yu, and R.R. Gutell. 2003. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 2002. 3, 2-31.
- DeLong, E.F., G.S. Wickham, and N.R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243, 1360-1363.
- Hwang, S., S.J. Kim, C.K. Kim, Y. Kim, S.J. Kim, and Y.C. Kim. 1999. The *phnJ* genes encoding acetaldehyde dehydrogenase (acylating) and 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase in *Pseudomonas* sp. DJ77 and their evolutionary implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 469-473.
- Kim, C.K., J.W. Kim, Y.C. Kim, and T.L. Mheen. 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. J. Microbiol.* 24, 67-72.
- Kim, S.J., H.J. Shin, Y. Kim, S.J. Kim, and Y.C. Kim. 1997b. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas* sp. DJ77 *phnG* gene encoding 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 41-45.
- Kim, S.J., J. Chun, K.S. Bae, and Y.C. Kim. 2000. Polyphasic assignment of an aromatic-degrading *Pseudomonas* sp., strain DJ77, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas chungbukensis* sp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1641-1647.
- Liesack, W., and E. Stackebrandt. 1992. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174, 5072-5078.
- Maidak, B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Jr. Parker, P.R. Saxman, J.M. Stredwick, G.M. Garrity, B. Li, G.J. Olsen, S. Pramanik, T.M. Schmidt, and J.M. Tiedje. 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28, 173-174.
- Mathews, D.H., M.D. Disney, J.L. Childs, S.J. Schroeder, M. Zuker, and D.H. Turner. 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7287-7292.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734-740.
- Retief J.D. 2000. Phylogenetic analysis using PHYLIP. *Methods Mol. Biol.* 132, 243-258.
- Takuchi, M., K. Hamana, and A. Hiraishi. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1405-1417.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

(Received January 20, 2005/Accepted June 1, 2005)

ABSTRACT : Nucleotide Sequence and Secondary Structure of 16S rRNA from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77

Kwan-Young Lee, Hae-Ryong Kwon, Won-Ho Lee, and Young-Chang Kim^{1*} (School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea, ¹Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea)

A 16S ribosomal RNA gene from *S. chungbukensis* DJ77 has been sequenced. This sequence had a length of 1,502 bp and was extended for 29 bp at 5' and for 37 bp at 3' from the partial sequence (1,435 bp) registered in 2000 year. Besides, 1 bp was newly added near to the 3' end. We made the secondary structure of the 16S rRNA based on *E. coli* model and found four specific regions. We found constant and variable regions in genus *Sphingomonas* as the result of multiple alignment of 16S rRNA gene sequences from *Sphingomonas* spp. and *S. chungbukensis* DJ77. We found a stem loop structure in *S. chungbukensis* DJ77, which was only discovered in *C. jejuni* to date. It showed the structural agreement despite the difference of the sequences from the both organisms. Finally, *S. chungbukensis* DJ77 belonged to cluster II (*Sphingobium*) group, after the classification using phylogenetic analysis and nucleotide signature analysis.