

더덕에서 Glutathione S-transferase (CIGST) 유전자의 분리

김진주, 양덕춘*

경희대학교 생명과학대학 한방재료가공학과

Isolation of Gglutathione S-Ttransferase(CIGST) Gene from *Codonopsis lanceolata*

Jin-Ju Kim, Deok-Chun Yang*

Dept. of Oriental Medicinal Material and Processing, College of Life Science
Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

ABSTRACT

A cDNA clone homologous to glutathione S-transferase gene was isolated and characterized from *Codonopsis lanceolata*(CIGST). The CIGST is 761 nucleotides long and has an open reading frame of 522 bp with a deduced amino acid sequence of 173 residues. The CIGST shows meaning homology to *A. thaliana*(AAC63629) 71%, *C. chinense*(CAI51314) 73%, *E. esula*(AAF65767) 75%, *H. muticus*(CAA55039) 70%, *N. plumbaginifolia*(CAA96431) 77%, *S. commersonii*(AAB65163).

Key words : glutathione S-transferase, *Codonopsis lanceolata*

서언

식물체는 자연적이거나 인위적으로 형성된 스트레스에 의해 합성된 세포 독소들에 대하여 다양한 용도의 detoxification system을 가지고 있으며 세포조직의 ROS(Reactive Oxygen Species)를 빠르고 효과적으로 제거할 수 있는 고분자 항산화 효소와 항산화 물질들을 만들어 낸다(Allen et al. 1994; Allen 1995) 그중 세포초제 저항성, 다양한 스트레스 및 중금속 독성발현에 영향을 미치는 유전자 중의 하나가 GST(glutathione S-transferase)이다. GST

효소는 친전자적 중심을 가지고 있으며 지방에 친화적인 생체 이물과 내부에서 생산된 독성물질들을 환원된 glutathione과 결합을 형성하게 하는 효소이다. (Coles et al. 1990; Mannervik et al. 1985; Pickett et al. 1989). GST들은 환원된 형태의 glutathione(GSH)과 친전자적 물질사이에 phase II conjugation을 형성하도록 촉매하며 이렇게 형성된 conjugate들은 분자량이 커져서 세포의 액포 또는 세포질로 이동하여 불활성이며 수용성이고 모성분보다 덜 독성이 있는 물질을 생성하고, 또한 GST는 세포내 돌연변이원의 독소와 발암물질 또는 다른 독성이

*교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

있는 물질들을 제거한다. (Mannervik *et al.* 1985; Picket *et al.* 1983)

GST(glutathione S-transferase)는 유해한 친전자성 물질이나 체내에서 일차적으로 산화과정을 거친 생성물들을 glutathione 과 conjugation시켜 배설을 촉진함으로써 농약의 효과를 저해시키는 것으로 알려져 있다 (Dauteman, 1994; Hughes와 Raftos, 1985; 송등, 1993).

제초제의 불활성화는 효소 또는 비효소적인 반응을 통하여 나타나며, 효소적 반응의 경우에는 GST(glutathione S-transferase)가 불활성화 반응을 촉매한다(Anderson *et al.* 1991; Lamoureux *et al.* 1986; Dean *et al.* 1990; 1991; Gronwald *et al.* 1989). 최근 다양한 농약의 종류와 사용등으로 藥害가 나타나고 있는바 藥害輕減劑(herbicide safener)의 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 중 chloroacetanilide계 제초제에 대한 약해경감효과의 발현과 제초제 불활성화효소인 GST(glutathione S-transferase)의 활성 증대사이에는 고도의 상관성이 인정되었다(Gronwald *et al.* 1987)

藥害輕減劑에 의한 GST(glutathione S-transferase)활성증대를 이해하기 위한 연관 기작으로서 식물 성장조절물질과 제초제 유사물질의 역할이 보고되고 있다. (Takahashi *et al.* 1992; Stephenson *et al.* 1983) 담배에서 얻어진 auxin조절 c-DNA인 *par B*는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) 존재하에서 GST활성을 갖는 분자량 23,965의 단백질을 발현함이 확인됨으로써 식물체 중에서 일어나는 chloroacetanilide계 제초제의 불활성화 반응에 대한 식물성장조절물질의 역할 가능성이 제시 되었다. (Takahashi *et al.* 1992)

atrazine이 수년간 반복처리된 지역에서 발생한 저항성 잡초종에서는 GST의 활성증대를 통하여 감수성종에 비하여 atrazine의 불활성화가 촉진됨이 보고 된 바 있다. (Anderson *et al.* 1991)

식물체내로 흡수된 metolachlor의 대부분이 GSH와 conjugation에 의한 대사를 통하여 신속한 제초제의 불활성화에 의하여 나타난다고 보고 되었다. (Chun *et al.* 1994)

본 연구에서는 더덕(*Codonopsis lanceolata*)로부터 분리된 CIGST유전자와 다른 식물들과의 homology를 비교하였고, 이들 식물에서 GST유전자들간의 아미노산 서열을 비교 분석하였다. 비교적 단기간의 짧은 작물화 역사를 지닌 약용작물의 대표식물로서 식품과 약재로 이용되는 더덕의 뿌리에서 GST(glutathione S-transferase)에 대한 분자생물학적 연구는 자연적, 인위적으로 형성된 스트레스에 관련하여 점차 확산되는 더덕의 분자유종을 통한 스트레스 내성 증진에 기여할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구는 충남 농업기술원에서 재배된 4년생 더덕(*Codonopsis lanceolata*)의 주근과 기내에서 배양한 더덕을 시료로 사용하였다

RNA추출과 cDNA library 의 제작

Aqueous phenol extraction방법(Morris *et al.*, 1990)을 사용하여 더덕의 주근으로부터 total RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하는 과정은 공급자 매뉴얼을 따라 cDNA synthesis kit(Clontech, SMART cDNA library construction kit, USA)를 이용하여 수행하였다.

DNA 염기서열 분석

더덕의 뿌리cDNA library에서 선발된cDNA clone은 벡터 특이적인 sequencing primer를 이용하여 automatic DNA sequencer(ABI prism 3700)로 sequencing 하였다. 분석된 EST clone들의 기능동정은 NCBI의 blastx프로

그램을 사용하여 GeneBank의 중복되지 않은 단백질 database와의 비교를 통해 이루어졌다. 뉴클레오타이드와 아미노산의 서열분석 및 비교는 BioEdit(Ver 5.0.9)프로그램을 사용하여, 먼저 clustalW multiple alignment를 수행한 후 graphic view를 실행하였다. 염기서열의 비교는 NCBI의 DNA와 아미노산 database를 바탕으로 blast연산(Altschul *et al.*, 1990)을 통해 수행하였으며, Phylogenetic tree는 TreeView(ver 1.6.1)을 사용하여 나타내었다.

결과 및 고찰

더덕(*Codonopsis lanceolata*)으로부터 *CIGST*을 분리하여 염기서열을 분리한 결과, 761 bp의 길이로, 173개의 아미노산으로 번역되는 522 bp의 ORF를 가지고 있다. (Fig1).

*CIGST*유전자의 다른 식물과의 homology를 조사하기 위해서 NCBI의 blastx프로그램을 사용하여 GeneBank의 database와 비교를 해 본 결

과, *A. thaliana* (AAC63629) 71%, *C. chinense* (CAI51314) 73%, *E. esula* (AAF65767) 75%, *H. muticus* (CAA55039) 70%, *N. plumbaginifolia* (CAA96431) 77%, *S. commersonii* (AAB65163) 76%와 같이 여러 식물에서 *CIGST*유전자와 유의한 유사성을 나타내었다. (Table 1).

계통간의 유연성을 비교하기 위하여 TreeView 프로그램을 사용하여 더덕에서 얻어진 *CIGST*유전자의 아미노산 서열(ORF)과 여러식물들에서 밝혀진 GST(glutathione S-transferase)유전자들의 아미노산 서열(ORF)을 계통적으로 비교한 결과, GST(glutathione S-transferase) 유전자들 중 더덕에서 분리한 *CIGST* 유전자는 *A. thaliana* (AAC63629)와 가장 근연관계에 있는 것을 볼 수 있으며, *E. esula* (AAF65767), *N. plumbaginifolia* (CAA96431) 순으로 가깝게 나타났다.

CIGST 유전자를 활용하여 더덕에 재도입함으로써, 자연적 인위적인 스트레스에 대해서 저항성을 갖는 더덕의 분자육종을 위한 지속적인

```

1  ATGGCGATCATCAAAGTCCACGGCAACGCAGTTTCGACAAATGTGATCCGAGTTATTGCTTGCCTCTACGAAAAGGGGAT
   M A I I K V H S N A V S T N V I R V I A C L Y E K G I
81  CGATTTTCGATGCGGTTCCCGTCGCCATGTCCCGGGGGCCAATAAGAAGGAACCTTACCTTTCCCTGAACCCATTTGGTC
   D F D A V P V A M S A G A N K K E F Y L S L N F F G
161 AAGTTCCTGCATTCCGAAGATGGAGATCTCAAACCTCTTTGAATCAAGGGCAATTAACGAATACATTGCCAAAAGCATAACGCC
   Q V P A F E D G D L K L F E S R A I N E Y I A K A Y A
241 AAACAGGGAAACGAATTGGAATACGGGGAGGATTTGAAGAAGAATGCCATCATGACTGTGTGGTCATCGGTTGAAGCTCT
   K Q G N E L E Y G E D L K K N A I M T V W S S V E A L
321 GCAGTTTAACCCCGCCGCTTCCAAGCTGACGTGGGAGATAGTGGTTAAGCCGGCCTTTGGCATGGTTACAGACGATGCTG
   Q F N F P A S K L T W E I V V K P A F G M V T D D A
401 CCGTGTATGGAGCTTGAAGGTCAGCTAGCCAAGGTTCTGGATGTCTACGAGACTCGGCTGGGTCAATCAAAAATACTTGGGT
   A V M E L E G Q L A K V L D V Y E I R L G Q S K Y L G
481 GGAGACACGTTTACCTTGGCCGGATCTAAACCACCTCCCTAA
   G D T F F L A G S K P P F *
    
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *CIGST* from *Codonopsis lanceolata*. The positions of nucleotides are shown on the left.

Table 1. List of CIGST registered in other plants

Scientific names	Amino acid residue	Nucleotide identity(%)	GeneBank accession No.
<i>Codonopsis lanceolata</i>	173	-	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	215	71	AAC63629
<i>Capsicum chinense</i>	213	73	CAI51314
<i>Euphorbia esula</i>	213	75	AAF65767
<i>Hyoscyamus muticus</i>	212	70	CAA55039
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	203	77	CAA96431
<i>Solanum commersonii</i>	213	76	AAB65163

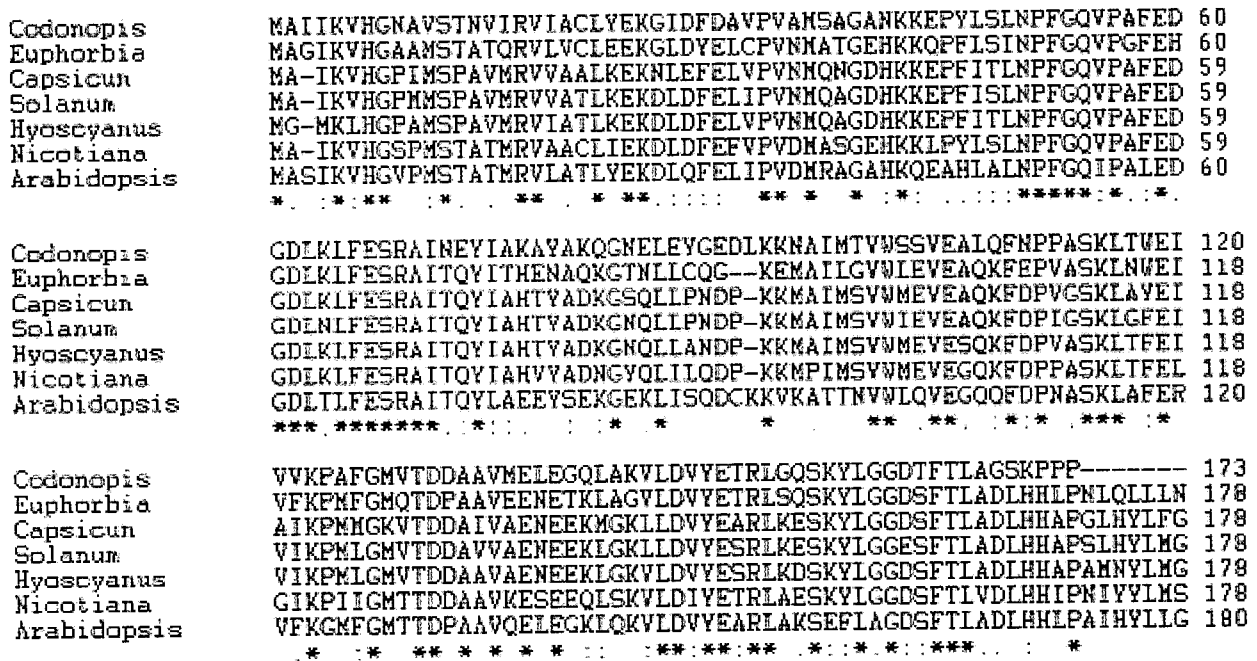


Fig. 2. Comparison of the amino acid residues among CIGST isolated in other plants. Identical amino acid are shown in asterisks and points marks.

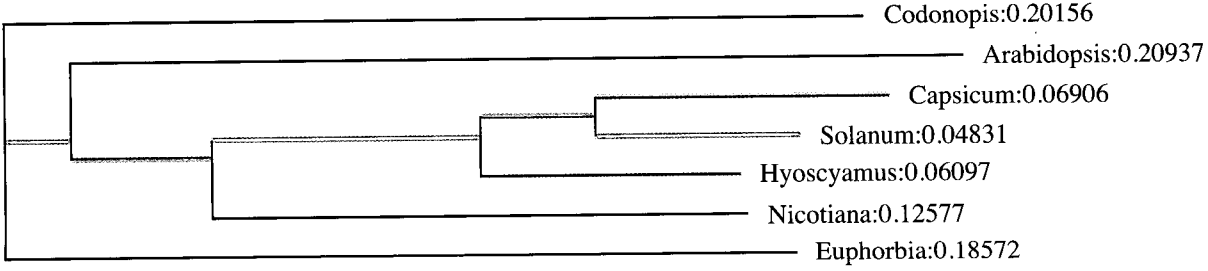


Fig. 3. Phylogenetic tree of CIGST gene based on the nucleotide sequence.

연구가 필요할 것이다.

적요

더덕 뿌리에서 유래한 EST cDNA library로부터 GST(glutathione S-transferase)유전자와 높은 상동성을 나타내는 full clone cDNA를 얻었다. 더덕의 GST(glutathione S-transferase), *CIGST*은 761 bp의 cDNA로 173개의 아미노산을 코딩하는 522 bp의 *ORF*를 가지고 있으며, *A. thaliana*(AAC63629) 71%, *C. chinense*(CAI51314) 73%, *E. esula*(AAF65767) 75%, *H. muticus*(CAA55039) 70%, *N. plumbaginifolia*(CAA96431) 77%, *S. commersonii*(AAB65163) 76%등 다른 식물에서 밝혀져 있는 GST(glutathione S-transferase)와 유사한 상동성을 나타내었다.

사사

본 연구는 농진청 Biogreen 21 사업의 특용작물 사업단의 연구지원금에 의하여 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

인용문헌

Altschul, S F., W. Gish, W. Miller, E W. Myers, and D.J.Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol Biol* 215 : 377-403-410.

Morris, P.C., A. Kumar, D.J.Bowles. and abscisic acid regulate the expression of the Em gene of wheat. *Eur. J Biochem.* 190 : 625-630.

Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plant *physiol.* 107 : 1-7

Allen RD, Sen-Gupta A, Webb RP, Holaday AS (1994) Protection of endogenous enzyme. In *Biology and Medicine*. Asada K, Yosikawa T(eds). Excerpta

Medica, Amsterdam. 321-322

Coles B, Ketterer B(1990) The role of glutathione and glutathione S-transferase in chemical carcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Biochem.*25 : 47-70

Mannervik B(1985) The isozymes of glutathione S-transferase. *Adv. Enzymol. Relat Mol. Biol.* 57 : 357-417

Pickett CB, Lu AY.(1989) glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 59 : 61-86

Anderson, M.P. and Gronwald, J.W.(1991). Atrazine resistance in a velvetleaf(*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. *Plant Physiol.*96 : 104-109.

Lamoureeux, G. L. and Rusness, D. G.(1986). Tridiphane[2-(3,5-dichlorophenyl)-2(2, 2,2-trichloro-ethyl) oxirane] an atrazine synergist : Enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor, *Pestic, Biochem. Physiol.* 26 : 323-342.

Dean J. V., Gronwald, J. W., and Eberlein, C. V. (1990). Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* 92 : 467-473.

Dean, J. V., Gronwald, J. W., and Anderson, M.P.(1991) glutathione S-transferase activity in nontreated and CGA-154281-treated maize shoots. *N. Naturforsch.* 46 : 850-855.

Gronwald, J. W.(1989). Influence of herbicide safeners on herbicide metabolism. In : *Crop safeners for herbicides*(K. K. Hatzios and R. E. Hoagland, ed). pp. 103-128. Academic Press.

Gronwald, J. W., Fuerst, E. P., Eberlein, C. V., and Egli, M. A.(1987). Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transferase activity of sorghum shoots.

Takahashi, Y. Nagata, T.(1992). par B : An auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Prpc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 56-59.

Stephenson, : G. R., Ali, A., and Ashton, F. M.(1983)
Influence of herbicides and antidotes on glutathione
levels of maize seedlings. In : pesticide chemistry
humanwelfare and the environment(J. Miyamoto and
p.c. kearny, ed). Vol3. pp.219-224. Pergamon.

Chun, J. C. and Ma, S.Y.(1994). Investigation of
herbicide safeners and its mode of safening action. I.
Effect of N-(4-chlorophenyl) maleimide on
metolachlor absorption and metabolism.

Dauteman, W. C. (1994) Introduction to biochemical
toxicity. pp.542-577. Detoxication metabolisms in
insect.

Hughes, P. B. and D. A. Raftos(1985) Genetics of an
esterase associated with resistance to
organophosphorus insecticides in the sheep blow fly,
Lucilia cuprina (Wiedemann) (Diptera:Calliphoridae).
Bull, Ent. Res. 75 : 535.

송승석, 오홍규, Naoki Motoyama (1993) Carboxyl
esterase S. 의 살충제 포장 저항성도의 계절적 변
동. 한국응용곤충학회지 32(3) : 348-353.

(접수일 2004. 1. 17)

(수락일 2004. 4. 10)