

Sphingomonas chungbukensis DJ77에서 Sphingosine Kinase를 암호화하는 *spk* 유전자의 동정과 대장균에서의 발현

이수리 · 엄현주 · 김영창^{1*}

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹충북대 바이오연구소

Sphingomonas chungbukensis DJ77의 유전체 서열분석 과정에서 969개의 nucleotide로 구성된 sphingosine kinase 유전자를 동정하였다. 이 sphingosine kinase 단백질의 아미노산 서열은 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4의 sphingosine kinase 아미노산 서열과 55%의 상동성을 보였다. 또한 다중서열정렬을 통해 각각 진핵세포의 sphingosine kinase의 C2, C3, C5 domain에 속하는 3개의 conserved sequence를 발견하였다. 그 중 하나는 sphingosine kinase에서 ATP-binding site일 것으로 예상되어지는 nucleotide-binding motif (GGDG)였고 나머지 둘은 아직 기능이 알려지지 않은 conserved sequences였다. 이러한 다중서열정렬을 바탕으로 계통수를 그려본 결과, *S. chungbukensis* DJ77의 sphingosine kinase (SPK)는 COG1597 그룹과 유사했으며, COG1597 내에서 동일종의 diacylglycerol kinase와는 서로 다른 그룹에 속하는 것으로 나타났다. 재조합 SPK는 이종(異種)세포인 *Escherichia coli* 내에서 성공적으로 과발현 되었으나, 세포 내에서 불용성 복합체(inclusion body)를 형성하였다.

Key words □ *Sphingomonas chungbukensis* DJ77, sphingosine kinase, *spk*

1884년 Johann L. Thudichum이 뇌조직에서 스펅고지질을 처음 발견한 후, 세포막 구성 성분으로만 생각되어 왔던 스펅고지질은 1987년도에 Hannun과 Bell이 스펅고지질에 의한 protein kinase C (PKC)의 억제작용을 발표하면서(2) 스펅고지질에 대한 인식이 단순히 세포막의 구성성분에서 생체기능을 조절하는 생체 내 활성분자로 새롭게 바뀌었다. 최근에는 ceramide와 sphingosine으로 대표되는 세포사멸(apoptosis) 유도 및 세포사멸의 신호전달물질로서의 스펅고지질에 대한 연구(1, 21, 23)는 물론 sphingosine-1-phosphate (S1P)와 sphingosylphosphorylcholine 등 세포 간 신호전달물질에 관한 연구(6, 18, 24)에 관심이 집중되고 있다. 특히 신호전달물질로서의 기능을 중심으로 한 스펅고지질의 생리활성조절작용은 산업적으로 이용 가능성이 크다.

스펅고지질은 sphingoid long-chain base(e.g. sphingosine), fatty acid, R group을 기본 구조로 갖는다. R group은 -H, phosphocholine, sugar(s)이며, 각각 ceramide, sphingomyelin, glycosphingolipid를 만든다. 스펅고지질은 진핵세포의 세포막 필수 구성 성분으로 알려져 있지만 박테리아에서는 일부 광합성 박테리아와 *Sphingomonas* 종에서만 그 존재가 확인되었다. 특히 *Sphingomonas* 종은 *Proteobacteria*의 α -4 subclass에 속하는 균 중 유일하게 스펅고지질을 생산하는 것으로 알려져 최근 새롭게 주목 받고 있다(9).

Sphingomonas 속이 그람 음성균으로서는 특이하게 lipopolysaccharide (LPS) 층 대신 세포막으로 갖는 glycosphingolipid

(GSL)은(25) 기본적으로 dihydrosphingosine, 2-hydroxy fatty acid, glucuronic acid (GlcA)으로 구성되어 있으며, GlcA에 해당되는 당 부분에 D-mannose (Man), D-galactose (Gal), D-glucosamine (GlcN), D-glucuronic acid (GlcA), D-galacturonic acid (GalA) 등이 결합하면서 다양한 구조를 만든다(7-9, 10-13, 20).

Sphingomonas 종의 세포막 구성 성분인 GSL은 그 구조가 많이 밝혀진데 반하여, 생합성 관련 유전자로 밝혀진 유전자는 serine palmitoyltransferase (SPT) 외에는 없다(5). 더욱이 진핵생물인 포유동물과 효모 사이에서도 스펅고지질 생합성 경로와 관련 유전자는 매우 다르다(4). 따라서 박테리아의 스펅고지질 생합성 관련 유전자 및 경로가 기존에 밝혀진 진핵세포의 그것과 다를 것으로 예상된다.

Sphingosine kinase (SPK)는 세포증식 및 성장에 관여하는 물질로 알려진 S1P를 생성하는 중요한 효소이다(3, 19). 진핵생물의 SPK는 매우 보존된 5개의 domain(C1-C5)을 가지고 있는데, 이 중 C1, C2, 그리고 C3 domain이 catalytic domain이며, C2 domain에 [SGDGX(17-21)K]의 서열로 이루어진 ATP-binding site를 가지고 있다(3). *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (16)은 난분해성 방향족 탄화수소 분해능(15), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), exopolysaccharide (EPS)와 같은 biopolymer 합성능과 함께 스펅고지질 생합성능을 가지고 있다고 알려져 있다. 본 연구팀에 의해 행해진 현재까지의 유전체 서열분석 결과를 바탕으로 *S. chungbukensis* DJ77의 sphingosine kinase 유전자(*spk*)를 찾고 그 기능을 밝히는 일은 아직까지 알려지지 않은 박테리아에서의 스펅고지질 생합성 대사경로를 밝히고, 원하는 스펅고지질의 합성을 생화학적으로 가능하게 함으로써, 궁극적으로는 스펅고지질

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-261-2302 Fax: 043-268-2538
E-mail: youngkim@chungbuk.ac.kr

의 산업적 이용 범위를 넓히는 기반이 될 것으로 예상된다.

본 논문에서는 *S. chungbukensis* DJ77의 스팅고지질 생합성에 관련하는 유전자 중 하나인 *spk* 유전자를 발굴하고 그 기능을 밝히고자 하는 연구 내용을 기록하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 실험에서 사용한 균주는 이미 보고된 바 있는 *S. chungbukensis* DJ77이다(16). 형질전환을 위한 숙주 균주로는 *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene Co, USA)를 사용하였고, cloning을 위한 vector로는 pBluescriptII SK(-) (Stratagene Co, USA)를 사용하였다. 목표 단백질의 발현 숙주 균주로는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, Germany), 발현 벡터로는 pET-21c (Novagen, Germany)가 이용되었다. 본 연구에 사용된 균주 및 plasmids의 특징은 Table 1과 같다.

배지 및 생장조건

S. chungbukensis DJ77과 *E. coli* 모두 LB 배지(1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 영양배지로 사용하였다. 고체 평판배지는 LB 배지에 agar powder를 1.5%(w/v)가 되도록 첨가하여 사용하였다. 실험 목적에 따라 streptomycin (50 mg/l), tetracycline (15 mg/l), chloramphenicol (34 mg/l), ampicillin (100 mg/l), X-gal (5-bromo-4-cholo-3-undoly-β-D-galactoside) (50 mg/l), 그리고 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (50 mg/l)를 배지에 첨가하였다. *S. chungbukensis* DJ77은 30°C에서 48-60 시간 동안, *E. coli*는 37°C에서 12-16시간 동안 진탕배양 하였다.

염기 서열 분석

S. chungbukensis DJ77의 유전체 사업을 수행하기 위하여 제작된 1-2 kb, 3-4 kb shotgun library와 40 kb fosmid library의 서열을 대상으로, 다음과 같은 생명정보학적 도구를 이용하여 염기 서열 분석을 하였다.

제작된 library들의 sequencing을 통하여 생성된 파일은 PHRED를 이용하여 서열의 품질을 검사하고, CROSS_MATCH를 이용하여 벡터서열을 제거한다. 이렇게 획득된 *S. chungbukensis* DJ77의 순수한 서열은 PHRAP을 이용하여 contig로 결합편집한다. 제작된 contig는 ORF finder와 Glimmer를 이용하여 ORF를 검색하고, 동정된 ORF는 BLASTP를 통하여 기능예측 한다.

spk 유전자의 cloning

spk 유전자의 cloning을 위하여 *S. chungbukensis* DJ77을 대상으로 primer를 제작하고 이를 이용하여 PCR하였다. 양방향 primer의 sequence 결정은 다음과 같은 과정으로 진행되었다. 우선, *S. chungbukensis* DJ77의 *spk* 유전자 서열 내에는 존재하지 않으면서, vector로 사용된 pET-21c의 multiple cloning site (MCS) 내에 존재하는 제한효소를 선정한다. Cloning 과정에서 유전자의 방향이 바뀌는 것을 막기 위하여 primer의 앞과 뒤에 서로 다른 제한효소 인식부위를 넣어주는데, 선정될 각각의 효소들은 6자리 제한효소 인식부위를 지나는 접착성말단(sticky end)이며 같은 buffer 조성을 사용할 수 있는 효소로 한다. 각각의 oligomer는 총 28mer로 결정하는데, *spk* 유전자 서열의 앞, 뒤 서열 일부를 각각 19 bases, 제한효소 인식부위 6 bases, endonuclease인 제한효소가 작용할 수 있도록 넣어준 5' 방향의 여분의 3 base로 이루어진다. 이와 같은 과정을 통하여 제작된 primers의 sequence는 각각 다음과 같다. SPKEX-21c L : 5' TAT GAA TTC CCA TGG TCC GCG TCG CCC T 3' (*EcoRI* site 포함), SPKEX-21c R : 5' TTA AAG CTT GGC CGC

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids	Relevant characteristics	Source or Reference
Bacterial strain		
<i>S. chungbukensis</i> DJ77	<i>str^r</i>	(14)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44hsdR17recA1endA1gyrA46thirelA1 lac F'[proAB⁺ lac^ΔlacZ·fΔM15Tn10(ter^r)]</i>	Stratagene Co., USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (rB⁻mB⁻) gal dcm (DE3)pLysS (Cm^R)</i>	Novagen, Germany
Plasmid		
pBluescriptII SK(-)	Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZ α</i> ; obtained from Stratagene Cloning Systems	Stratagene Co., USA
pET-21c	Ap ^r , T7lac promoter, C-terminal His · Tag	Novagen, Germany

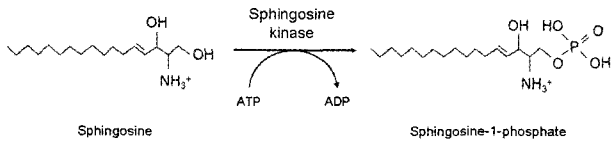


Fig. 1. The reaction catalyzed by sphingosine kinase. Sphingosine kinase catalyzes the conversion of sphingosine and ATP to sphingosine-1-phosphate and ADP.

CAG GCG AAG GAA C 3'(Hind III site 포함). 증폭되어진 PCR product는 EcoR I, Hind III로 절단하고, 같은 제한효소 처리된 pET-21c vector와 ligation한다. 이는 *E. coli* BL21(DE3) pLysS에 형질전환 되었다. 재조합된 plasmid는 제한효소 분석방법과 sequencing을 통하여 확인할 수 있었다.

SPK 단백질의 과발현

Cloning 된 SPK clone을 100 µg/ml의 ampicillin과 34 µg/ml의 chloramphenicol이 포함된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀이 0.6에 도달할 때까지 진탕배양 한다. 여기에 목표단백질의 과발현을 위하여 1 mM IPTG (Sigma, USA)을 넣고 3시간 동안 induction하였다. 배양된 세포는 5,000 × g, 4°C, 15 min.의 원심분리에 의하여 수확하였다. SPK의 과발현 여부는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 확인하였다.

결과 및 고찰

spk 유전자의 구조

S. chungbukensis DJ77의 genome project 과정 중 획득한 shotgun library sequence 파일과 fosmid library sequence 파일의 분석을 통해 spk 유전자를 동정하였다. spk 유전자는 개시코돈으로 ATG를 사용하고 종결코돈으로 TGA를 사용하는 969 bp의 open

```

gtgatccccgcacc
1 atggccggctggccctattgtccaaatcccaaatccacgggcaaccgagagcgtccggcgtgcccagctatggccgagcaacc
M V R V A L L S N P K S T G N R Q T L P R V R S Y C A S N P
91 gacatcttccatattgagatggaacatgtgcacagatcggccggcctccagaccatcgcccggtcgatccggtcgtcattcgtc
D I F H Y E V E H V D Q I G H A L Q T I A R V D P V V I V I
181 aacggccacgacgacagatgcaggccggcgtgaccgaactttatcagggcgagcatttccaggcccgatgcccggatcagcgtg
N G G D G T V Q A A L T E L Y D G E H F D G R V P P I A V L
271 ccaacggcaagaccacactgatcgcctcggcctcggcattcattggcgaiccgatcaaggccgtggaagaagatcgtccagatcgccag
P N G K T N L I A L D L G I H G D P I K A L E R I V Q I A K
361 gcggcgtcagcagaccatgctgctcgcaccgaactgatcgcctggtcgaagcggcagggaagcggcggcgtgctggcattgctc
A G V D D H V V A R E L I A L S D G Q A E S R P V L G M F L
451 ggtggccgggggtggccgacatatactcctcaccgcaaccagatctatcgttggcctgtccaacgacatcagtcatttctgaag
G G A G L A D Y M L Y C R N Q I Y P L G L S N G I S H F L T
541 gtcctcggctactcctcctccttgggggttctgcccgaatctcctcggcgaatccagcggcctccagtgctatctcctgatccp
V I A V L V S L V F G V R A R F L P Q S S R P M R I S L I R
631 gacggcgaactggccggcctcgcctcctgatcgtgacgacatggaacgatgctcctcggcctccttggccagtgtagcaggcgtg
D G O L A G R F A V L I V T T L E H L L L G V Q P G D S R R
721 ggcataatgaagctgatggcctcgcacagaaatcggcccccctgctgcccctcttggccagtgtagcaggcgtgtagcaggc
G N M K L M A V D Q N L A L L R L F W A S V T R V G K A
811 cagatgcaaggtatccatctggaacaggcagcgtgatccgatagaggccgaccacagcagcgtcactgtagcggcgaactgtccaa
Q M O G I H L E Q G D V I R I E G D H S S V I L D G E L F E
901 gcttccgaaggcaagccatcctcctcgcctcaccagcggcgtgcccgttcttccctcggccctga 969
A S E G K P I V L R S T E P V P F L R L A A *
    
```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of spk gene from *S. chungbukensis* DJ77. The DNA sequence of spk shows that the ORF of the DNA is 969 bp. Predicted peptide sequence is 322 aa with a predicted mass of 35.4 kDa. GenBank accession number is AY911410.

reading frame (ORF)이며, 이들이 암호화하고 있는 단백질의 분자량은 35.4 kDa일 것으로 예상되어진다(Fig. 2). 이 ORF의 G+C 함량은 64.4%이다.

SPK의 상동성 비교

S. chungbukensis DJ77의 spk 유전자를 바탕으로 예측된 아미노산 서열의 BLASTP 분석 결과, *Zymomonas mobilis* subsp. mobilis ZM4의 SPK 아미노산 서열(GenBank accession number YP_163126)과 55%의 상동성을 나타내었다. 또한 현재 밝혀진 다른 종의 SPK 아미노산 서열과 다중서열정렬을 수행한 결과, 각각 진핵생물 SPK의 C2, C3, C5 domain (17)에 속하는 3개의 conserved sequence를 발견하였다. 진핵생물의 SPK에 나타나는 5개의 conserved domain 중에서 C1, C2, C3 domain이 catalytic domain으로 알려져 있으므로(3), *S. chungbukensis* DJ77에서 나타나는 C2, C3 domain과 유사한 conserved sequence 역시 catalytic domain으로 작용할 것이라 추측된다. *S. chungbukensis* DJ77에서 발견된 3개의 conserved sequence 중에서 N-terminal 방향의 conserved sequence인 GGDG는 ATP-binding site로 여겨진다. 진핵생물 SPK의 SGDГ motif와 6-phosphofructokinase의 ATP-binding site의 일부분으로 이루어진 GGDГ motif 사이에 발견된 구조적인 유사성(22)과, 진핵생물 SPK의 C2 domain에 존재하는 [SGDГX(17-21)K] sequence는 ATP-binding site라는 보고(3)를 종합해보면, 동정된 *S. chungbukensis* DJ77의 SPK에 나타난 GGDГ motif가 ATP-binding site일 가능성이 높다. *S. chungbukensis* DJ77의 SPK 아미노산 서열의 중간부분에 나타나는 PXGXXN sequence는 C3 domain과, C-terminal 방향의 DGE sequence는 C5 domain과 유사하며, 정확하게 어떠한 기능을 갖는 motif인지 아직 알려진 바 없으나 보존된 지역임은 분명하다 (Fig. 3). C1, C4 domain과 상동성을 지니는 domain은 발견되지 않았는데, 다중서열정렬 결과 진핵생물의 SPK에서만 발견되고 원핵생물에서는 발견되지 않는 것으로 보아 C1, C4 domain이 진핵생물 특이적 domain이기 때문일 것으로 생각된다. 이러한 다중서열정렬분석을 바탕으로 COG0818 그룹(diacylglycerol kinase)과 COG1597 그룹(sphingosine kinase and enzymes related to eukaryotic diacylglycerol kinase), *Z. mobilis* subsp. mobilis ZM4의 SPK 아미노산 서열 두개(GenBank accession number YP_163126, YP_163163), 그리고 *S. chungbukensis* DJ77의 diacylglycerol kinase (DAGK) (GenBank accession number AY911411)를 비교군으로 하여 계통수를 작성하였다. *S. chungbukensis* DJ77의 SPK는 COG0818 그룹보다는 COG1597 그룹에 더 가까웠고, COG1597 내에서 동일종의 DAGK와는 서로 다른 그룹에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이를 통하여, 본 연구에서 동정한 *S. chungbukensis* DJ77의 spk 유전자가 sphingosine kinase라는 결론을 얻었다.

***E. coli*에서 SPK의 발현과 불용성 복합체(inclusion body)의 형성**

S. chungbukensis DJ77의 spk 유전자가 *E. coli* pET system에

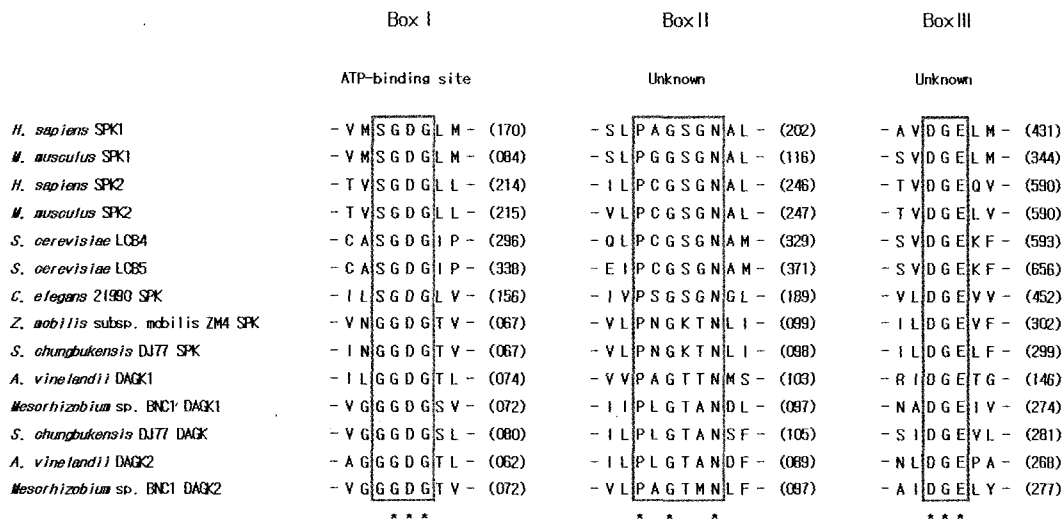


Fig. 3. Alignment of the conserved protein sequences of sphingosine kinases from different organisms. The conserved regions of sphingosine kinase are shown as boxes. SPK1 of *Homo sapiens* (NP_892010); SPK1 of *Mus musculus* (NP_079643); SPK2 of *Homo sapiens* (AAH10671); SPK2 of *Mus musculus* (NP_975009); LCB4 of *Saccharomyces cerevisiae* (NP_014814); LCB5 of *Saccharomyces cerevisiae* (NP_013361); SPK of *Caenorhabditis elegans* (NP_495847); *Zymomonas mobilis* subsp. mobilis ZM4 (YP_163126); SPK of *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (AY911410); DAGK1 of *Azotobacter vinelandii* (ZP_00341924); DAGK1 of *Mesorhizobium* sp. BNC1 (ZP_00193486); DAGK of *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (AY911411); DAGK2 of *Azotobacter vinelandii* (ZP_00090435); DAGK2 of *Mesorhizobium* sp. BNC1 (ZP_00197707). Alignment was performed with ClustalX, version 1.8.1.

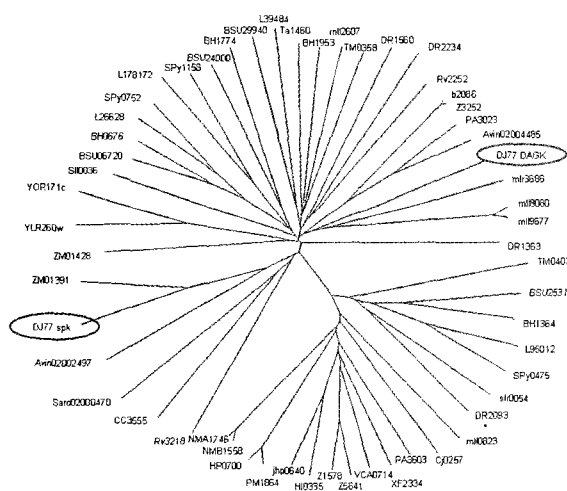


Fig. 4. The phylogenetic tree of several organisms, based on the distance matrix analysis of the SPK and DAGK sequence by ClustalX. TM0407 (NP_228217, *Thermotoga maritima* MSB8); DR2093 (NP_295816, *Deinococcus radiodurans* R1); L95012 (NP_267243, *Lactococcus lactis* subsp. lactis I11403); SPy0475 (NP_268765, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS); BSU25310 (NP_390409, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis str. 168); BH1364 (NP_242230, *Bacillus halodurans* C-125); slr0054 (NP_442209, *Synechocystis* sp. PCC 6803); Z1578 (NP_287082, *Escherichia coli* O157:H7 EDL933); Z5641 (NP_290676, *Escherichia coli* O157:H7 EDL933); PA3603 (NP_252293, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1); VCA0714 (NP_233101, *Vibrio cholerae* O1 biovar eltor str. N16961); HI0335 (NP_438499, *Haemophilus influenzae* Rd KW20); PM1864 (NP_246803, *Pasteurella multocida* subsp. multocida str. Pm70); XF2334 (NP_299613, *Xylella fastidiosa* 9a5c); NMB1558 (NP_274565, *Neisseria meningitidis* MC58); NMA1746 (NP_284461, *Neisseria meningitidis* Z2491); HP0700 (NP_207494, *Helicobacter pylori* 26695); Cj0257

(NP_281451, *Campylobacter jejuni* subsp. jejuni NCTC 11168); jhp0640 (NP_223358, *Helicobacter pylori* J99); ml10823 (NP_102544, *Mesorhizobium loti* MAFF303099); Ta1460 (NP_394912, *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728); YLR260W (NP_013361, *Saccharomyces cerevisiae*); YOR171C (NP_014814, *Saccharomyces cerevisiae*); TM0358 (NP_228169, *Thermotoga maritima* MSB8); DR2234 (NP_295956, *Deinococcus radiodurans* R1); DR1363 (NP_295086, *Deinococcus radiodurans* R1); Rv2252 (NP_216768, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv); Rv3218 (NP_217734, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv); L26628 (NP_266576, *Lactococcus lactis* subsp. lactis I11403); L178172 (NP_267893, *Lactococcus lactis* subsp. lactis I11403); L39484 (NP_267955, *Lactococcus lactis* subsp. lactis I11403); SPy0752 (NP_268975, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS); SPy1158 (NP_269308, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS); BSU29940 (NP_390872, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis str. 168); BSU06720 (NP_388554, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis str. 168); BSU24000 (NP_390280, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis str. 168); BH0676 (NP_241542, *Bacillus halodurans* C-125); BH1774 (NP_242640, *Bacillus halodurans* C-125); sl10036 (NP_442724, *Synechocystis* sp. PCC 6803); b2086 (NP_416590, *Escherichia coli* K12); Z3252 (NP_288591, *Escherichia coli* O157:H7 EDL933); PA3023 (NP_251713, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1); ml12607 (NP_103911, *Mesorhizobium loti* MAFF 303099); ml18080 (NP_108258, *Mesorhizobium loti* MAFF303099); mlr3686 (NP_104744, *Mesorhizobium loti* MAFF303099); ml19677 (NP_109525, *Mesorhizobium loti* MAFF303099); CC3555 (NP_422349, *Caulobacter crescentus* CB15); Avin02004485 (ZP_00090435, *Azotobacter vinelandii*); Avin02004485 (ZP_00341924, *Azotobacter vinelandii*); Saro02000470 (ZP_00304688, *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444); ZMO1391 (YP_163126, *Zymomonas mobilis* subsp. mobilis ZM4); ZMO1428 (YP_163163, *Zymomonas mobilis* subsp. mobilis ZM4); SPK of *S. chungbukensis* DJ77 (AY911410); DAGK of *S. chungbukensis* DJ77 (AY911411).

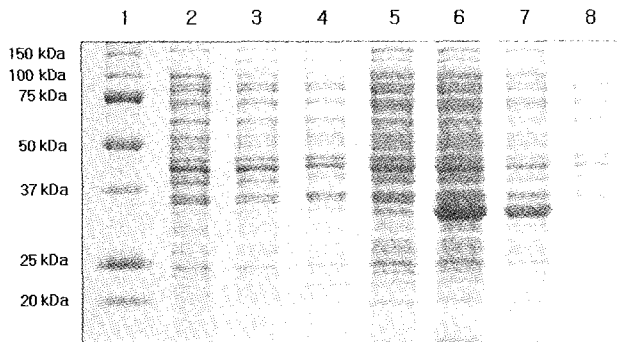


Fig. 5. Expression of recombinant SPK in *E. coli*. Samples of different fractions of *E. coli* were run in 12.5% SDS-PAGE gel, with protein molecular weight markers (M) in lane 1 and total cell lysate of *E. coli* BL21(DE3)pLysS in lane 2. Total lysates of cells harboring pET-21c before and after IPTG induction were run in lanes 3 and 4, respectively. Total lysates of cells harboring pET-21c::SPK before and after IPTG induction were run in lanes 5 and 6. Pellet and supernatant of the lysate of cells harboring pET-21c::SPK after IPTG induction were in lanes 7 and 8. Protein bands were visualized by Coomassie blue staining after gel electrophoresis.

서 성공적으로 과발현 하는 것을 확인하였다. 발현된 재조합 SPK는 cloning vector로부터 유래한 T7·Tag과 His·Tag을 각각 N-terminal과 C-terminal에 가지고 있다. 그러므로 발현된 재조합 SPK의 분자량은 35.4 kDa의 SPK와 fusion protein을 포함하여 38.6 kDa일 것으로 예상하였다. SDS-PAGE의 결과, 재조합 SPK는 33 kDa 정도의 band를 나타냈다. SDS-PAGE 상에서 단백질의 운동성은 단백질의 속성에 따라 약간씩 다르게 나타나므로 예상 크기와 발현된 단백질 사이의 크기 차이는 동정한 SPK의 기능에 크게 문제가 될 것 같지 않다. 재조합 SPK는 불용성 복합체(inclusion body) 형태로 발현되었으며, 이는 세포 분획물 별 SDS-PAGE에서 pellet에 SPK가 존재했다는 사실(Fig. 5. lane 7)과, sonication 시에는 상층액(Fig. 5. lane 8)에서 발견되지 않았던 SPK가 detergent 사용 시에는 상층액(Fig. 5. lane 6)에서 발견되었다는 사실을 통해 알 수 있었다. 분리된 SPK 불용성 복합체는 다른 protein에 오염되지 않아 상대적으로 순수한 편이다(Fig. 5). 불용성 복합체 형태의 재조합 SPK는 Protein Refolding Kit (Novagen, Germany)를 사용하여 분리, 정제 및 가용화할 수 있을 것이다.

본 연구를 통해서, *S. chungbukensis* DJ77의 *spk* gene이 sphingosine kinase를 암호화하는 유전자라는 것이 입증되었다. 향후 연구는 SPK를 분리하고 정제하여, 가용화된 재조합 SPK의 활성 측정에 대하여 초점이 맞추어질 것이다.

감사의 말

이 연구는 한국산업기술재단 지원의 『지역전략산업 석·박사 연구인력 양성사업』 연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Cuvillier, O. 2002. Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 153-162.
- Hannun, Y.A. and R.M. Bell. 1987. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses. *Science* 235, 670-674.
- Herve, L.S., S. Milstien, and S. Spiegel. 2004. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J. Cell Biochem.* 92, 882-899.
- Herve, L.S., C. Peterson, H. Liu, S. Milstien, and S. Spiegel. 2002. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1582, 8-17.
- Hiroko, I., H. Hayashi, and H. Kagamiyama. 2001. A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain. *J. Biol. Chem.* 276, 18249-18256.
- Hla, T., M.J. Lee, N. Ancellin, J.H. Paik, and M.J. Kluk. 2001. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science* 294, 1875-1878.
- Ingar, O. and E. Jantzen. 2001. Sphingolipids in bacteria and fungi. *Anaerobe* 7, 103-112.
- Kawahara, K., B. Lindner, Y. Isshiki, K. Jakob, Y.A. Knirel, and U. Zahringer. 2001. Structural analysis of a new glycosphingolipid from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas adhaesiva*. *Carbohydr. Res.* 333, 87-93.
- Kawahara, K., H. Kuraiahi, and U. Zahringer. 1999. Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp. and their distribution among members of the α -4 subclass of *Proteobacteria*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 408-413.
- Kawahara, K., H. Moll, Y.A. Knirel, U. Seydel, and U. Zahringer. 2000. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 267, 1837-1846.
- Kawahara, K., M. Kubota, N. Sato, K. Tsuge, and Y. Seto. 2002. Occurrence of an α -galacturonosyl-ceramide in the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 289-294.
- Kawahara, K., U. Seydel, M. Matsuura, H. Danbara, E. Th. Rietschel, and U. Zahringer. 1991. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS Lett.* 292, 107-110.
- Kawasaki, S., R. Moriguchi, K. Sekiya, T. Nakai, E. Ono, K. Kume, and K. Kawahara. 1994. The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 176, 284-290.
- 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.S. Kim, S.J. Kim, and Y. C. Kim. 1997. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas* sp. DJ77 *phnG* gene encoding 2-hydroxybenzoic semialdehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 41-45.
- Kim, S.J., J.S. 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.
- Kohama, T., A. Olivera, L. Edsall, M.M. Nagiec, R. Dickson, and S. Spiegel. 1998. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23722-23728.
- Lynch, K.R. and D.S. Im. 1999. Life on the edge. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 473-475.
- Maceyka, M., S. G. Payne, S. Milstien, and S. Spiegel. 2002. Sph-

- ingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 193-201.
20. Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, K. Kobayashi, Y. Kato, and I. Yano. 2000. A novel sphingoglycolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of *Sphingomonas yanoikuyae*. *J. Bacteriol.* 182, 2660-2663.
21. Pettus, B.J., C.E. Chalfant, and Y.A. Hannun. 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 114-125.
22. Stuart M.P., P.A.B. Moretti, J.R. Zebol, R. Zareie, C.K. Derian, A. L. Darrow, J. Qi, R.J.D'Andrea, C.J. Bagley, M.A. Vadas, and B. W. Wattenberg. 2002. The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1. *J. Biol. Chem.* 277, 49545-49553.
23. Spiegel, S, D. Foster, and R. Kolesnick. 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 159-167.
24. Spiegel, S. and S. Milstien. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 397-407.
25. Yabuuchi, E., E. Tanimura, A. Ohyama, I. Yano, and A. Yamamoto. 1979. *Flavobacterium devorans* ATCC 10829; a strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 95-107.

(Received February 3, 2005/Accepted June 3, 2005)

ABSTRACT : Identification of the *spk* Gene Encoding Sphingosine Kinase in *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 and Its Expression in *Escherichia coli*

Su-Ri Lee, Hyun-Ju Um, and Young-Chang Kim^{1*} (School of Life Sciences, Chungbuk National University, Biotechnology Research Institute, ¹Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea)

The sphingosine kinase gene, which is 969-nucleotide long, was identified during the whole genome sequencing of *Sphingomonas chungbukensis* DJ77. The amino acid sequence showed the identity of 55% with that of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4. C2, C3, and C5 domains of eukaryotic sphingosine kinase were found in sphingosine kinase from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77. One of these three conserved sites, GGDG, was predicted as a ATP-binding site, and the functions of the others were unknown currently. The phylogenetic tree constructed by ClustalX indicated that the sphingosine kinase of *S. chungbukensis* DJ77 was near the phylogenetic group COG1597, and did not belong to the group of diacylglycerol kinase of the same strain. The recombinant sphingosine kinase was expressed in *Escherichia coli*, but it was made in form of inclusion body.