

## *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbCD* 유전자의 클로닝과 *Escherichia coli*에서의 발현

김치경\* · 성태경 · 남정현 · 김영창 · 이재구<sup>1</sup>

충북대학교 미생물학과 농화학과<sup>1</sup>

Polychlorinated biphenyls(PCBs)와 biphenyl을 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서는 그 초기 분해과정에 *pcbABCD* 유전자들이 관여하고 있음이 밝혀졌다. 그 중 *pcbCD*와 *pcbD* 유전자를 *E. coli* XL1-Blue에 클로닝하여 *E. coli* CU103과 CU105 균주를 각각 제조하였다. *E. coli* CU103은 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase(2,3-DHBP)와 meta-cleavage compound (MCP) hydrolase를 생성하여 2,3-dihydroxybiphenyl을 benzoate로 변환시켜 주었다. *E. coli* CU1과 CU103에서 *pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase의 활성도는 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 보다 약 17배 높았으며, *E. coli* CU105에서 *pcbD*의 산물인 MCP hydrolase는 약 3배 더 높게 나타났다.

**KEY WORDS** □ *pcbCD* gene, 4CB degradation, cloning, 2,3-DHBP dioxygenase, MCP hydrolase

Polychlorinated biphenyl(PCBs)은 냉각제, 윤활제, 농약, 제지과정 등에서 각종 용제로 사용되기 때문에 이들에 의한 생태계의 오염은 날로 심각해지고 있다. 이와같은 염소화 방향족 탄화수소(chlorinated aromatic hydrocarbons)들은 자연계에서 잘 분해되지 않고 생물체의 지질에 축적되어 인체에까지 악영향을 유발시키기 때문에, 환경보건학적으로 주목받는 오염물질들이다. PCBs에 대한 미생물의 분해정도는 biphenyl에 치환되어 있는 염소의 수와 위치에 따라 다양하며, 염소의 수가 많을수록 난분해 특성을 나타낸다(3). 그러나 biphenyl의 한쪽 벤젠 환에 염소가 붙어있지 않는 PCBs는 그 고리에서 미생물에 의한 개환이 보다 쉽게 일어나 생분해성이 높다고 한다(17).

미생물에 의한 4-chlorobiphenyl(4CB)의 초기 분해과정에는 4가지의 효소가 관여한다(10). 4CB는 4-chlorobiphenyl dioxygenase(*pcbA*의 산물)와 dihydrodiol dehydrogenase(*pcbB*의 산물)의 작용에 의하여 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl로 변환된다. 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl은 *pcbC*(또는 *cbpC*) 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase에 의해 벤젠 환의 1번과 2번 위치에서 meta-cleavage 방법으로 개환이 일어나 2-hydroxy-6-oxo-6-(4-chloro-phenyl)hexa-2,4-dienoic acid(HOPDA) 또는 meta-cleavage product(MCP)로 변환된다. 이 분해산물은 *pcbD* 유전자의 산물인 MCP hydrolase에 의해 benzoate(BA)와 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid로 분해된다.

Walia 등(18)은 *cbpABCD*를 *Pseudomonas putida*에서 클로닝하였고, Mondello(14)와 Furukawa 등(5)

은 각각 *Pseudomonas* sp. LB400과 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707에서 *bphABCD* 유전자를 클로닝하였다. 또 Ahmad 등(1)은 *Pseudomonas testosteroni* B-356에서 cloning한 *bphA* 유전자에 dechlorination activity도 연관되어 있다고 보고한 바 있다. 본 연구실에서도 PCBs를 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 biphenyl(BP) 및 4-chlorobiphenyl(4CB)의 분해효소를 암호화하는 *pcbABCD* 유전자를 클로닝하였다(7).

*pcbC* (또는 *bphC*)의 산물인 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase(2,3-dihydroxybiphenyl: oxygen 1,2-oxidoreductase)는 extradiol-type dioxygenase이며, 2,3-DHBP에 산소원자 2개를 삽입시켜 2-hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoic acid로 변환시키는, 즉 biphenyl 및 4CB의 한쪽 벤젠 환의 개환작업을 촉매하는 특성을 가지고 있다. 이와 같은 벤젠의 개환작용은 난분해성 방향족 탄화수소의 오염물질을 분해할 수 있는 중요한 기능을 수행하기 때문에, 2,3-DHBP dioxygenase는 매우 중요한 효소이다. 본 연구실에서는 이미 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 2,3-DHBP dioxygenase를 순수분리하여 효소학적 특성을 보고한 바 있다(16).

그러므로 본 연구에서는 4-chlorobiphenyl과 biphenyl을 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 분해 특성을 자세히 밝히고 또 보다 효율적인 분해균주를 생물공학적으로 개발하기 위하여, 4CB를 분해하여 4CBA로 변환시키는 과정에 관여하는 유전자인 *pcbCD*를 *E. coli* XL1-Blue에 클로닝하고 이 유전자의 구조와 발현을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 방향족 탄화수소

실험에 사용한 방향족 탄화수소들 중 4-chlorobiphenyl(4CB)과 biphenyl(BP)은 동경화성으로부터, 그리고 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP)은 Wako Chemical Ind., Ltd.로부터 구입하였다. 4-chlorobenzoate(4CBA)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고, MCP(*meta*-cleavage compounds)는 본 연구실에서 Ahmad 등의 방법(1)으로 제조하여 사용하였다.

### 균주 및 플라스미드

본 실험에 사용한 균주 및 plasmids는 Table 1과 같다. 4CB 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 Kim 등(11)에 의해 분리되었다. *Pseudomonas* sp. DJ-12 뿐만 아니라 cloned cells들은 Kiyohara 등(12)의 방법으로 MM2 최소배지에 4CB 또는 BP를 단일탄소원으로 첨가하여 배양하였다. 완전배지로는 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone 10 g/l, Bacto yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.0)을 사용하였고 고체배지의 경우에는 한천을 1.5%로 첨가하였다.

### DNA 조작

플라스미드를 포함하는 chromosomal DNA를 분리할 때에는 Ausubel 등(2)의 방법을 사용하였고, 플라스미드 DNA는 Sambrook 등(15)의 방법으로 분리하였다. T4 DNA ligase와 제한효소들은 모두 Promega Co.로부터 구입하였으며, 반응조건은 공급

회사의 사용지침에 따랐다. 전기영동은 horizontal electrophoresis system을 이용하여 0.7~1.0%의 agarose gel에서 실시하였다. 전기영동에는 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) 또는 TBE buffer(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하여 5 V/cm 이하로 전개시켰다. 전기영동 후 gel은 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 용액에서 40 분간 염색한 후 UV-transilluminator(305 nm)로 관찰하였고, 사진은 UV DNA SLII camera system (Seolin)을 이용하여 촬영하였다.

### *pcbCD* 유전자의 클로닝

4CB의 ring cleavage에 관여하는 *pcbABCD*의 유전자군을 우선 cloning하기 위하여 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 total DNA를 *EcoRI*로 절단한 절편들과 *EcoRI*로 처리한 pBluescript SK(+) vector를 3:1의 비율로 혼합하고 T4 DNA ligase를 이용하여 16 °C에서 16시간 ligation시켰다. 반응이 끝난 시료는 Sambrook 등(15)의 방법에 따라 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켰다. 형질전환체의 선발은 100 µg/ml의 ampicillin과 15 µg/ml의 tetracycline, 그리고 40 µl의 X-gal(20 mg/ml)와 4 µl의 isopropylthio-µ-D-galactoside(IPTG; 200 mg/ml)를 첨가한 LB 한천배지에서 흰색을 띄는 집락들을 1차로 선발하였다. 선발된 형질전환 집락에 0.1%의 2,3-DHBP 용액을 분무하여 *meta*-cleavage compounds(MCPs)에 의한 황색 발색균주를 선발하였고, 이 *pcbABCD*의 재조합 플라스미드를 pCU1이라 명명하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmids	Relevant marker(s)	Sources
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4CB <sup>+</sup> , 2,3-DHBP <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , PCA <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup>	Kim <i>et al.</i> (11)
<i>E. coli</i> CU1	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU1 4CB <sup>+</sup> , BP <sup>+</sup> , 2,3-DHBP <sup>+</sup> Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Han <i>et al.</i> (7)
<i>E. coli</i> CU103	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU103 2,3-DHBP <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i> CU105	<i>E. coli</i> XL1-Blue containing pCU105 MCP <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	↗
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supe44 hsdR17 recA1 thi</i> F'[ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>h</sup> <i>lacZ</i> ΔM15 Tn10( <i>ter</i> ) <sup>r</sup> ]	Stratagene Ltd.
pCU1	<i>pcbABCD</i> , Ap <sup>r</sup> , 6.4 kb <i>EcoRI</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+)	Han <i>et al.</i> (7)
pCU103	<i>pcbCD</i> , Ap <sup>r</sup> , 3 kb <i>Sall</i> , <i>EcoRI</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+)	This study
pCU105	<i>pcbD</i> , Ap <sup>r</sup> , 1.6 kb <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+)	↗
pBluescript SK(+)	Ap <sup>r</sup> , contains <i>lacZ</i> promoter for fusion protein induction	Stratagene Ltd.

4CB, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; 2,3-DHBP, 2,3-dihydroxybiphenyl; MCP, *meta*-cleavage product; 4CBA, 4-chlorobenzoate; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline.

pCU1의 제한효소 지도에 따라 *EcoRI*-*SalI* 절편 (2.2 kb)과 *SalI*-*EcoRI* 절편(3.0 kb)들을 상기의 방법과 같은 요령으로 *EcoRI*-*SalI*로 처리한 pBluescript SK(+) vector에 삽입시키고 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 *E. coli* CU101과 CU103의 형질전환균주를 얻었다. 이때 3.0 kb의 *SalI*-*XhoI* 절편을 pBluescript SK(+) 벡터에 pCU103에서와 반대방향으로 삽입시켜 pCU104를 얻었다. 계속적으로 pCU103에 *EcoRI*/*HindIII*를 처리한 후 상기와 동일한 방법으로 pCU105를 얻었다. 이상의 방법으로 얻은 각 clone에 대하여 *pcb* 유전자의 발현을 검정하고, 재조합 유전자의 제한효소지도도를 작성하였다.

**분해산물의 GC-MS 분석**

4CB 분해균주에 의한 분해산물의 검정은 UV-spectrophotometry로 검정하였으며, 재조합 플라스미드에 존재하는 *pcbCD* 분해유전자의 발현은 Khan 등(8)의 방법을 일부 변형하여 GC-Mass spectrophotometry (GC-MS)를 이용하는 resting cell assay로 검정하였다. 4CB 분해균주 및 *pcbCD* 유전자의 cloned cell을 LB 액체배지에서 10<sup>9</sup>/ml이 될 때까지 배양한 다음, 원심분리하여 phosphate buffer(pH 7.0)로 세척하여 resting cell을 준비하였다. 이 균체는 2,3-DHBP가 0.1 mM씩 포함된 MM2 액체배지에 접종하여 37°C에서 반응시켰다. 일정시간에 따라 반응배지를 채취하여 4,000 ×g로 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 동일량의 diethyl ether로 분해산물을 추출하고 진공 건조시킨 다음 20 μl의 pyridine(Aldrich Chemical Co.)과 50 μl의 trimethylsilyl(TMS) amidazol(Aldrich Chemical Co.)로 dry block에서 30분간 40°C를 유지하며 TMS유도체를 만들었다. TMS유도체의 분석은 HEWLETT 5890 PACKARD series II를 사용하여 분석하였다. 사용한 column은 SPB-1(Supew, 30 m, 0.25 mm I.D., film thickness 0.25 μm, fused silica)을 사용하였다. 이때 초기온도는 100°C, 최종온도는 250°C, 초기시간은 1분, 최종시간은 2분, 그리고 온도 증가율은 20°C/min으로 하였다. 헬륨가스는 1 ml/min으로 주입하였으며 MS는 70 eV에서 작동시켰다.

**효소의 활성 측정**

*Pseudomonas* sp. DJ-12 또는 *E. coli* CU103을 LB broth에서 18시간 배양한 후 배양액을 4,000 ×g에서 원심분리하여 potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척하고 동일 buffer에 현탁하였다. 초음파 파쇄기(Fisher M-300)로 세포를 파쇄하고 28,000 ×g에서 30분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 효소액으로 사용하였다(4). 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) dioxygenase의 활성은 1 mM의 2,3-DHBP를 25°C에서 반응시킨 후 생성되는 meta-cleavage product(MCP)의 양으로 측정하였다. 2,3-DHBP dioxygenase의 1 unit은 1분당 1 μM의 MCP를 생성할 수 있는 효소의 양으로 결정하였으며, MCP hydrolase의 1 unit은 10 μM의 MCP를 가수분해시킬

수 있는 효소의 양으로 결정하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(13)으로 실시하였고, 표준 단백질로는 bovine serum albumin(BSA, Sigma Kit No. P 5656)을 사용하였다.

**결 과**

***pcbCD* 유전자의 클로닝**

*Pseudomonas* sp. DJ-12의 total genomic DNA와 pBluescript SK(+) DNA를 *EcoRI*으로 처리한 후 ligation하여 Fig. 1에서와 같이 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환하였다. 이들 집락 중에서 1%의 2,3-DHBP 용액을 분무할 때 노란색을 나타내는 집락용 *E. coli* CU1 형질전환 균주로 선발하였다. *E. coli* CU1은 4 CB 및 BP를 분해하는 *pcbABCD*가 있는 재조합 플

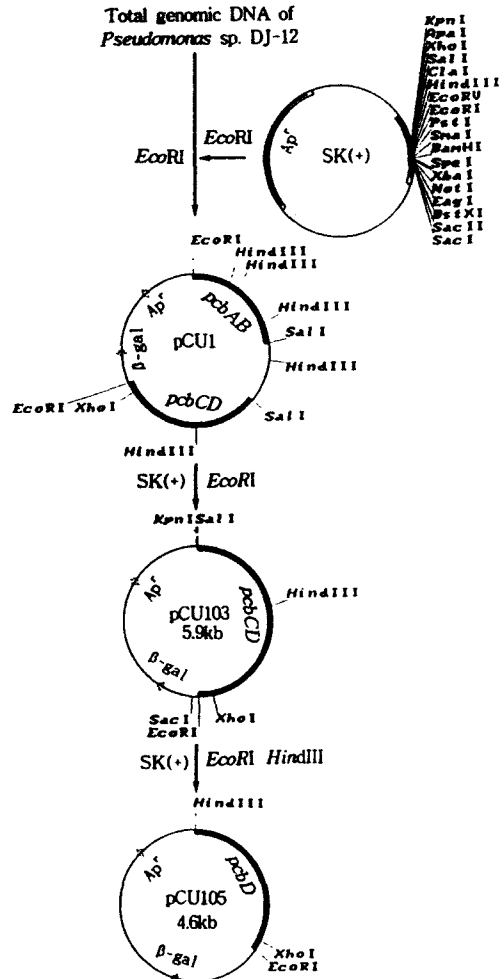


Fig. 1. Construction strategy for the hybrid plasmids of pCU1, pCU103, and pCU105.

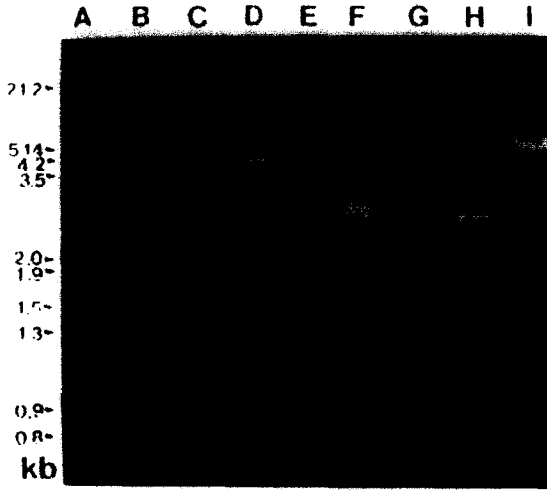


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pCU103. Electrophoresis was carried out in gels containing 1% agarose. Lane A,  $\lambda$ -EcoRI-HindIII; Lane B, EcoRI-Sall; Lane C, EcoRI-HindIII-Sall; Lane D, EcoRI-HindIII; Lane E, HindIII-Sall; Lane F, XhoI; Lane G, XhoI-HindIII; Lane H, Sall-XhoI; Lane I, HindIII.

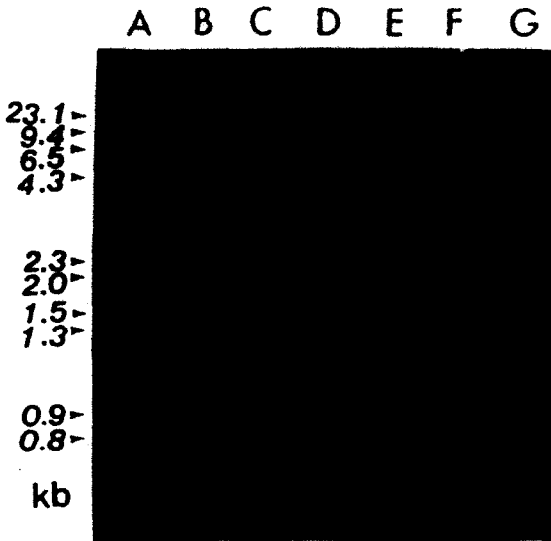


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pCU105. Electrophoresis was carried out in gels containing 1% agarose. Lane A,  $\lambda$ -HindIII; Lane B,  $\lambda$ -EcoRI-HindIII; Lane C, pCU103-EcoRI-HindIII; Lane D, pCU105-HindIII; Lane E, pCU105-EcoRI-HindIII; Lane F, pBluescript SK(+)-EcoRI-HindIII; Lane G, pCU103-Sall-XhoI.

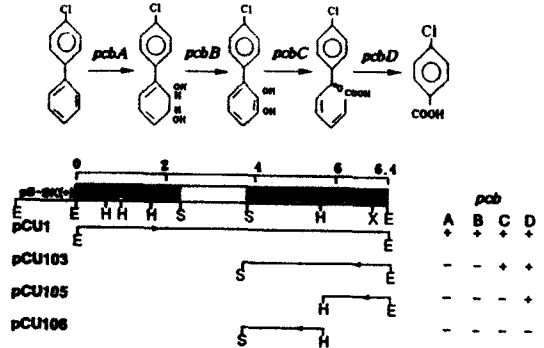


Fig. 4. Catabolic pathway of 4CB to 4CBA and physical map of the recombinant plasmids of pCU1, pCU103, pCU105 and pCU106. E, EcoRI; H, HindIII; S, Sall; X, XhoI; +, express; -, no express; pB-SK(+), pBluescript SK(+) vector; *pcbA*, 4-chlorobiphenyl dioxygenase; *pcbB*, dihydrodiol dehydrogenase; *pcbC*, 2,3-dihydroxy-4-chlorobiphenyl dioxygenase; *pcbD*, meta-cleavage compound hydrolase.

라스미드인 pCU1을 가지고 있음을 확인하였다. pCU103은 Fig. 2에서와 같이 *pcbCD*를 포함하는 약 3 kb의 EcoRI 절편이 2.96 kb의 pBluescript SK(+)와 재조합된 plasmid임을 알 수 있었다. pCU103 plasmid에서 *pcbCD* 유전자의 존재와 위치를 결정하기 위하여, EcoRI, Sall, HindIII 등의 효소로 단일 또는 이중 절단하여 그 절편들을 전기영동하였다. pCU1 plasmid를 EcoRI-Sall 이중 절단하여 1.6 kb 정도의 절편을 pBluescript SK(+) vector에 삽입하여 pCU105를 만들었다. pCU105의 insert DNA에는 Fig. 3에서와 같이 *pcbD* 유전자를 포함하고 있는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로부터 작성한 *pcbCD* 유전자의 제한효소 지도와 *pcbABCD* 유전자의 활성은 Fig. 4와 같다.

분해산물의 분석

각 clone들의 2,3-DHBP 분해능을 검증하기 위하여 GC-MS 및 UV-spectrophotometer를 이용한 resting cell assay를 한 결과는 Fig. 5와 같다. E. coli CU103에 대하여 2,3-DHBP를 기질로 하였을 때 2,3-DHBP dioxygenase에 의해 2,3-DHBP는 감소하면서 MCP가 생성되었다. 이 MCP는 다시 MCP hydrolase에 의해 bezoate로 분해되는 것이 UV-spectrophotometer로 확인되었다. 이러한 결과는 E. coli CU104에서도 동일하였다. E. coli CU103 균주에 대한 GC-MS spectra는 Fig. 6과 같다. E. coli CU103은 2,3-DHBP를 기질로 했을 때, *pcbCD*의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase와 MCP hydrolase에 의해 2,3-DHBP가 분해되어 Fig. 6(A)에서와 같이 3.07분의 retention time(RT)에서 peak가 나타났다. 이를 mass spectrum으로 분석한 결과 Fig. 6(B)에서와 같이

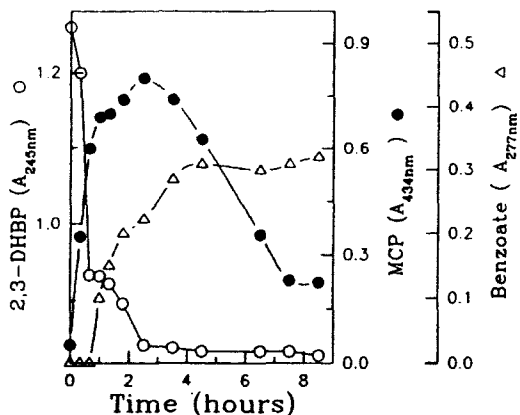


Fig. 5. The metabolites produced from degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl by *E. coli* CU103. 2,3-DHBP, 2,3-dihydroxybiphenyl; MCP, meta-cleavage product.

benzoate가 검정되어 pCU103의 3 kb 절편에 *pcbCD* 유전자가 있다는 것이 확인되었고 이 유전자들은 *E. coli*에서도 정상적으로 발현된다는 것을 알 수 있었다. *E. coli* CU105 균주에 대하여 MCP를 기질로 했을 때에도 *E. coli* CU103 균주에서와 같은 결과를 얻었다.

#### *pcbCD* 유전자산물의 활성

*pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase (2,3-DHBD)의 활성도를 *Pseudomonas* sp. DJ-12 그리고 *E. coli* CU1 및 *E. coli* CU103 등 재조합균주의 세포 추출물에서 측정된 결과는 Table 2와 같다. *E. coli* CU1과 *E. coli* CU103에서 2,3-DHBD의 효소 활성은 *Pseudomonas* sp. DJ-12보다 약 17배 높았으며, *E. coli* CU105에서 *pcbD* 유전자의 산물인 MCP hydrolase의 활성도는 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서보다 약 3배 높게 나타났다.

#### 고 찰

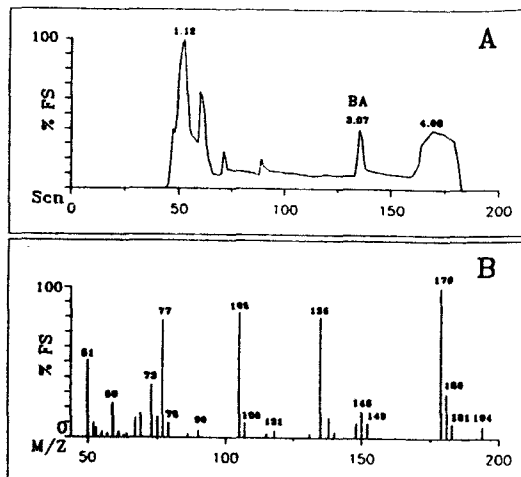


Fig. 6. GC-MS spectra of trimethylsilyl (TMS) derivatives of the metabolites from 2,3-dihydroxybiphenyl by *E. coli* CU103. (A) GC profile of the metabolites including benzoate (BA) at RT of 3.07 min. (B) Mass spectrum of benzoate.

본 실험에 사용한 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 4 CB와 BP를 모두 분해할 수 있었으며, 그 분해 과정은 Khan과 Walia(9) 그리고 Ahmad 등(1)이 보고한 것과 같이 meta-cleavage 분해경로를 통하여 이루어지며, 최소한 네가지의 다른 효소, 즉 chlorobiphenyl dioxygenase(*pcbA*의 산물), dihydrodiol dehydrogenase(*pcbB*의 산물), 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl dioxygenase(*pcbC*의 산물), meta-cleavage product hydrolase(*pcbD*의 산물)가 관여하고 있었다(7, 19).

본 연구에서 GC-MS와 UV-spectrophotometry를 이용한 assay에 의하면 *E. coli* CU104는 *pcbCD* 유전자를 갖고 있으며, *E. coli* CU101은 *pcbAB* 유전자를 갖고 있는 것이 전보에서 확인되었다(7). 이러한

Table 2. Activities of 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHBP) dioxygenase and MCP hydrolase in *Pseudomonas* sp. DJ-12, *E. coli* CU1, *E. coli* CU103, and *E. coli* CU105

Bacterial stains	Activity <sup>a</sup> of	
	2,3-DHBP dioxygenase	MCP hydrolase
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	1.3	12
<i>E. coli</i> CU1	23	7
<i>E. coli</i> CU103	20	7
<i>E. coli</i> CU105	0	33
<i>E. coli</i> XL1-Blue	0	0

<sup>a</sup>One unit of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase activity is equal to formation of 1  $\mu$ M meta-cleavage product from the substrate per min at 25°C. One unit of MCP hydrolase activity is equal to hydrolysis of 10  $\mu$ M of meta-cleavage compound, which was measured as the decrease rate of the absorbance at 434 nm.

유전자에 의한 4CB의 분해과정은 Furukawa와 Miyazaki(6)가 언급한 분해과정과 동일한 것을 알 수 있다. 이상의 결과에서 *E. coli* CUI01은 *pcbAB* 유전자를, CUI03과 CUI04는 *pcbCD* 유전자를, CUI05는 *pcbD* 유전자를 갖고 있음을 알았다. 4CB의 초기 분해과정에 관여하는 *pcbABCD* 유전자군의 제한효소 지도와 유전자의 위치를 Fig. 4에서와 같이 밝힐 수 있었다. 특히 *pcbCD* 유전자는 vector인 pBluescript SK(+)와 반대방향으로 위치한 pCUI04에서도 잘 발현되었기 때문에 독립된 promoter를 갖고 있는 것으로 해석되었다.

*Pseudomonas* sp. DJ-12, *E. coli* CUI, 그리고 *E. coli* CUI03에서 *pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase(2,3-DHBD)의 활성도가 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서보다 약 17배 이상 높았는데, 이것은 *E. coli*에 존재하는 SK(+) vector의 높은 복제수에 기인하는 동시에 *E. coli*의 RNA polymerase가 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcb* 유전자의 promoter를 잘 인식하는 것으로 생각된다.

Furukawa 등(5)은 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC* 유전자를 probe로 이용하여 자연계에서 분리한 biphenyl 분해균주와 Southern hybridization을 실시하여 염기서열의 상이성을 분석하고 각 균주를 분류하였다. Walia와 Khan 등(18)도 *P. putida* OU83의 *cbpABCD* 유전자군을 DNA probe로 이용하여 토양 환경에 존재하는 4CB 분해 세균을 colony hybridization 기법으로 탐색하여 4CB로 오염된 환경에서 분해 유전자군의 분포 및 지역적 편차를 확인한 바 있다. 따라서 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbABCD* 유전자를 DNA probe로 이용하여 자연계에서 분리된 4CB 및 biphenyl 분해 세균들간의 상이성과 *cbp* 및 *bph* 유전자들과의 유연관계를 조사해 볼 필요가 제기된다. 또 4CB의 ring cleavage에 관여하는 *pcbABCD* 유전자 뿐 아니라, 이들 유전자의 상이성, dechlorination 활성, 그리고 이들 전 과정에 관여하는 유전자와 효소들에 대해서도 분자생물학적 특성이 더 자세히 밝혀져야 4CB를 완전히 분해할 수 있는 새롭고 강력한 균주의 개발이 가능해질 것이다.

## 사 사

본 논문은 교육부의 학술연구조성비(1987년과 1988년의 유전공학연구)에 의하여 이루어졌으며, 연구결과의 일부는 서울대 분자미생물학 연구센터의 지원으로 수행되었음.

## 참 고 문 헌

- Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse, 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the meta-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1375-1385.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Berdard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.T. Brennan, M.L. Herberl, and C. Johnson, 1986. Rapid assay for the screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 761-768.
- Bollag, D.M. and S.J. Edelman, 1991. Protein methods. Wiley-Liss. New York.
- Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka, 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: Some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* 171, 5467-5472.
- Furukawa, K. and T. Miyazaki, 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166, 392-398.
- Han, J.J., T.K. Sung, and C.K. Kim, 1993. Cloning and expression of *pcbAB* genes from *Pseudomonas* sp. DJ-12 in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 31, 129-135.
- Khan, A. and S. Walia, 1989. Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 798-805.
- Khan, A. and S. Walia, 1990. Identification and localization of 3-phenylcatechol dioxygenase and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4-dienoatehydrolase genes of *Pseudomonas putida* and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 956-962.
- Khan, A. and S. Walia, 1991. Expression, localization, and functional analysis of polychlorinated biphenyl degradation genes *cbpABCD* of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1325-1332.
- Kim, C.K., J.W. Kim, and Y.C. Kim, 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* 25, 122-128.
- Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 454-457.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, N.E. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mondello, F.J., 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* 171, 1725-1732.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989.

1. Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse, 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the meta-

- Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
16. Sung, T.K., J.H. Nam, and C.K. Kim, 1993. Enzymatic properties of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase purified from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 150-156.
  17. Tucker, E.S., V.W. Saeger, and O. Hicks, 1975. Activated sludge primary biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **14**, 705-713.
  18. Walia, S., A. Khan, and N. Rosenthal, 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 254-259.
  19. Yun, D.J., J.J. Han., and C.K. Kim, 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4-chlorobiphenyl catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 53-59.

(Received December 27, 1993)

(Accepted January 12, 1994)

---

**ABSTRACT: Cloning and Expression of *pcbCD* Genes in *Escherichia coli* from *Pseudomonas* sp. DJ-12**

**Kim, Chi-Kyung\***, Tae-Kyung Sung, Jung-Hyun Nam, Young-Chang Kim, and Jae-Koo Lee' (Department of Microbiology and 'Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

The *pcb* genes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 coded for the catabolism of polychlorinated biphenyl (PCBs) and biphenyl. The products of the *pcbCD* genes were 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl dioxygenase and *meta*-cleavage product (MCP) hydrolase, which acted on degradation of 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl to 4-chlorobenzoate. The *pcbCD* genes were cloned in *E. coli* XL1-Blue, and then the *pcbD* gene was further subcloned. As a metabolite transformed from 2,3-dihydroxybiphenyl by the cloned cell of *E. coli* CU103, benzoate was detected by the resting cell assay. The enzyme activities of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase and MCP hydrolase produced in the cloned cells *E. coli* CU103 and CU105 were about 17 and 3 times higher than those of *Pseudomonas* sp. DJ-12, respectively.