

## *Pseudomonas* sp. DJ77 균주에서 Extradiol Dioxygenase를 암호화하는 *phnQ* 유전자의 클로닝과 대장균에서의 발현

신희정 · 박용춘 · 민경희<sup>1</sup> · 김치경 · 임재윤 · 김영창\*

충북대학교 생명과학부, <sup>1</sup>숙명여자대학교 생물학과

*Pseudomonas* sp. DJ77의 게놈 library로부터 phenanthrene 분해에 관련된 유전자를 포함하는 약 5-kb의 *Xho*I 절편을 pBLUESCRIPT SK(+)로 클로닝하였으며, 이 재조합 plasmid를 pUPX5라 명명하였다. 이 재조합 균주에 catechol과 2,3-dihydroxybiphenyl 용액을 분무하면 노란색의 meta-cleavage 화합물이 생성됨을 관찰할 수 있었다. 그리고 효소 활성을 측정된 결과 catechol에서보다 2,3-dihydroxybiphenyl에 더 큰 활성을 나타냈다. 이 부분에 존재하는 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase 유전자의 위치를 결정하고, 이 유전자를 *phnQ*라 명명하였다.

KEY WORDS □ *Pseudomonas* sp. strain DJ77, *phnQ* gene, 2,3-dihydroxybiphenyl, extradiol dioxygenase

미생물에 의해 방향족 탄화수소가 생분해 되기 위해서는 벤젠 고리가 깨어져야만 한다. 이 반응을 촉매하는 효소는 그 작용 양상에 따라 크게 두 부류로 구분된다. 즉 벤젠 고리에 인접하여 붙어 있는 두 개의 수산기 안쪽에 위치한 C-C결합을 끊어주는 intradiol dioxygenase(ortho-cleavage 효소)와 바깥쪽에 위치한 C-C결합을 끊어주는 extradiol dioxygenase(meta-cleavage 효소)가 있다. 지금까지 많은 종류의 균주에서 이러한 ring-cleavage dioxygenase들이 발견되어 보고되었다(1, 5, 9, 12, 13, 16, 17). Harayama와 Reik(5)에 의하면, 이 두 형태의 효소는 여러 상이한 효소적 특성을 나타내며, 가장 큰 차이점은 intradiol type은 Fe(III)를 가지고 있고, homomultimers 또는 두 종류의 다른 단위체들로 구성되어 있는 반면, extradiol type은 Fe(II)를 가지며, 한 종류의 단위체들로 구성되어 있다는 점이다.

그 중 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase는 biphenyl의 한 쪽 벤젠 고리를 개환하는 extradiol type의 효소이다. 2,3-dihydroxybiphenyl은 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase에 의해 meta-cleavage되어 노란색을 띠는 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate(HOPDA)로 전환된다. Hirose(7) 등은 여러 가지 *Pseudomonas* 종에 존재하는 다양한 extradiol dioxygenases의 기능과 구조적 관계에 관해 이미 보고한 적이 있다. 그리고 Han(4) 등은 *Pseudomonas cepacia* LB 400으로부터 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase의 결정 구조를 밝혀 하나의 Fe(II)를 가지고 있는 monomer의 active form으로 되어 있으며, Fe(II) 중심에 하나의 axial His-146과 네 개의 ligand들(His-210, Glu-260, 2H<sub>2</sub>O)이 결합되어 있다고 보고하였다.

Phenanthrene 분해 균주인 *Pseudomonas* sp. DJ77에서도 catechol 2,3-dioxygenase인 PhnE extradiol dioxygenase가 발

견되어 보고한 적이 있다(10, 11). 그 후 방향족 탄화수소 분해 과정에 관계되는 다른 유전자를 클로닝하기 위해 게놈 library를 제조하여 이미 클로닝된 pHENX7의 DNA를 탐침자로 이용하여 상류부분과 하류부분을 클로닝하여 연구하는 과정에서 2,3-dihydroxybiphenyl을 기질로 하여 meta-cleavage 화합물을 형성하는 새로운 clone을 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 균주, plasmids 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 이미 보고한 바 있는 *Pseudomonas* sp. DJ77(8)을 사용하였다. 형질 전환을 위한 숙주로는 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고, library를 제조하기 위한 vector와 숙주균주로는 Promega사의 λGEM11과 *E. coli* LE392를 이용하였으며, 클로닝 vector로는 pBLUESCRIPT SK(+) phagemid(Stratagene Co.)를 사용하였다. 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. 완전 배지로는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하였다.

#### DNA 추출 및 조작

*Pseudomonas* sp. DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy(15) 등의 방법에 따라 추출하였으며 plasmid DNA는 Sambrook(14) 등의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한 효소 및 T4 DNA ligase 등은 Boehringer Mannheim GmbH, POS-COCHEM(남도 과학), 그리고 New England Biolab 등으로부터 구입하여 사용하였으며, 반응 조건은 제조 회사의 처방에 따랐다.

#### Plaque Hybridization

Plaque hybridization은 Promega사에서 제공된 방법과 nylon

\*To whom correspondence should be addressed

막을 이용한 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham) kit를 사용하였다. Plaque이 형성된 배지위에 nylon 막을 올려 놓아 phage DNA를 흡착시키고, 탐침자로는 pHENB10의 상류부분 말단 900 bp를 포함하고 있는 pXN9을 DNA labeling reagent와 glutaraldehyde 용액을 이용하여 37°C에서 10분간 반응시켜 사용하였다. Hybridization 용액은 hybridization 완충용액에 blocking agent와 NaCl을 각각 5% 및 0.5 M되게 첨가하였고 hybridization 조건은 42°C에서 16-20시간 행하였다. 세척은 1차 세척 완충용액(0.4% SDS, 0.5×SSC)을 이용하여 55°C에서 20분간 2회 반복한 후, 2차

세척 완충용액(2×SSC)을 이용하여 상온에서 5분간 세척을 2회 반복하였다. 검출은 검출용액 1과 검출용액 2를 동량 섞어준 후 상온에서 nylon 막 위에 정확히 1분 반응시켰다. 그리고 SaranWrap으로 nylon 막을 감싸고 Hyperfilm-ECL을 이용하여 1분간 노출시킨 후 현상액 및 고정액을 이용하여 필름을 현상하였다.

### 효소 활성 측정

*phnQ* 유전자를 가지고 있는 재조합 균주들을 OD<sub>600</sub>에서 0.1이 될 때까지 배양한 후 IPTG를 40 µg/ml되게 첨가하여 OD<sub>600</sub>에서 0.8이 될 때까지 배양한 세포를 4°C에서 원심 분리하여 회수한 후 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 2회 세척한 후 동일 buffer에 현탁하여 얼음물 중탕으로 1분 간격으로 30초씩 7-8회 sonication함으로써 세포를 완전히 파쇄하였다. 그리고 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 반응에 이용하였다. 효소의 활성은 Hegeman(6)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, spectrophotometer를 이용하여 catechol은 375 nm( $\epsilon=33000 \text{ M}^{-1}$ )(2), 2,3-dihydroxybiphenyl은 434 nm( $\epsilon=13200 \text{ M}^{-1}$ )(3)에서 흡광도가 증가되는 것을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### *phnQ* extradiol dioxygenase 유전자의 클로닝 및 제한 효소 지도

방향족 탄화수소 분해에 관여하는 유전자의 상류부분과 하류부분을 클로닝하기 위해 pHENX7의 양쪽 말단 DNA를 탐침자로 하여 *Pseudomonas* sp. DJ77의 게놈 library를 대상으로 plaque hybridization을 실시하였다. 그 결과 pHENX7의 대부분을 포함하고 있는 약 10-kb *Bgl*III 절편을 클로닝하여 pHENB10이라 명명하고, pHENX7의 상류 부분에 해당하는 pHENB10의 말단 부위의 염기 서열을 부분적으로 결정할 결과 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase 유전자의 일부분과 상동성이 높게 나타났다. 따라서 pHENB10의 상류 부위를 가지고 있는 pXN9의 DNA를 탐침자로 하여

Bacterial strains	Relevant characteristics	References
<i>Pseudomonas</i> sp. strain DJ77	Phn <sup>+</sup> Bph <sup>+</sup>	8
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44hsdR17recA1endA1gyrA46thirelA1lacF</i> [ <i>proAB+lacF</i> ] <i>lacZ</i> ΔM15Tn10( <i>tet</i> )	14
<i>E. coli</i> LE392	<i>supE44supF58hsdR514galK2galT22metB1trpR55lacY1</i>	14
Plasmids		
pBluescript SK(+)	Ap <sup>r</sup>	Stratagene Co.
pHENB10	10-kb <i>Bgl</i> III fragment of chromosomal DNA	This work
pUPX5	5-kb <i>Xho</i> I fragment of phage DNA	This work
pUPX5001	2-kb <i>Eco</i> RI-SalI fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5013	1.5-kb <i>Xho</i> I- <i>Eco</i> RV fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5014	1.5-kb <i>Xho</i> I- <i>Eco</i> RV fragment of pUPX5 in KS(+)	This work
pUPX5019	2.3-kb <i>Clal</i> - <i>Xho</i> I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5021	3-kb <i>Psp</i> 1406I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work

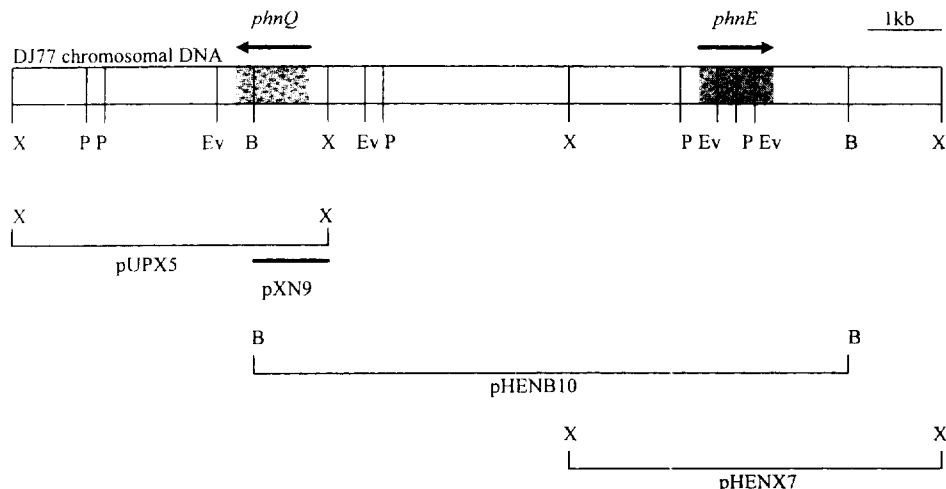


Fig. 1. Restriction map of the cloned region in chromosomal DNA of *Pseudomonas* sp. DJ77. The *phnE* gene locus also indicated as previously reported(11). Abbreviations: B, *Bgl*III; P, *Pst*I; Ev, *Eco*RV; X, *Xho*I.

완전한 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase 유전자를 클로닝하기 위해 다시 한번 plaque hybridization을 실시하였다. 그 결과 여러 개의 positive signal이 나타났으며, 그 여러 개의 plaque들로부터 단일 plaque을 분리하여 DNA를 추출하고, *Xho*I로 절단한 후, pHENB10의 상류 부위 일부분

을 포함하는 5-kb 절편을 회수하여 *Xho*I로 절단한 SK(+) vector와 ligation하였다. 여기에서 얻어진 clone은 2,3-dihydroxybiphenyl을 분무하였을 때 노란색의 meta-cleavage 화합물을 생성하였고, 이를 pUPX5라 명명하였다(Fig. 1). pUPX5의 제한 효소 지도를 작성하기 위해 plasmid DNA를 여러 가지 제한 효소로 절단하였으며, 이미 cloning된 pHENB10과 겹쳐지는 부분의 *Xho*I, *Eco*RI, *Bgl*III의 제한 효소 위치를 확인하였고, pUPX5의 제한 효소 지도를 작성하였다(Fig. 2).

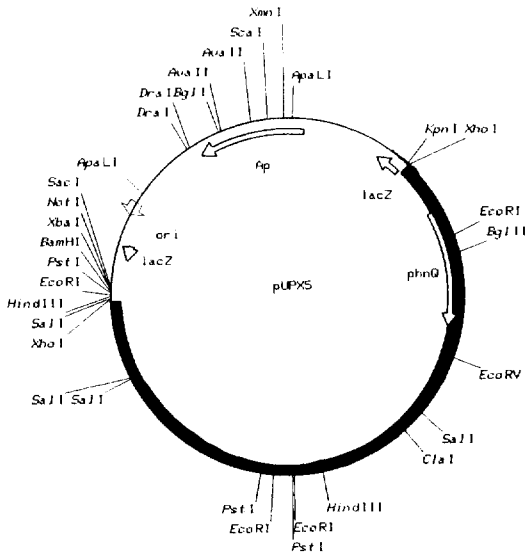


Fig. 2. Restriction map of pUPX5. The DNA fragment which is cloned from *Pseudomonas* sp. DJ77 is presented on a black box. Arrowheads indicate the direction of transcription.

**phnQ 유전자의 위치**

본 실험에서는 *phnQ* 유전자의 위치를 결정하고 효소 활성을 조사하기 위해 제한 효소 위치를 이용하여 여러 가지 subclone을 제조하여 2,3-dihydroxybiphenyl을 분무한 후 노란색을 띠는 clone을 선발하고, 그 subclone들을 이용하여 *phnQ* 유전자의 위치를 확인하였다(Fig. 3). *phnQ* 유전자는 pHENB10과 pUPX5의 중복되는 부분 약 900 bp 정도에 걸쳐 존재하고 있었다. *phnQ* 유전자를 포함하는 subclone들의 효소 활성을 측정한 결과, pUPX5021을 제외한 pUPX5, pUPX5013, pUPX5014, pUPX5019에서는 모두 비슷한 수준의 비교적 낮은 활성을 볼 수 있었다. 또, 이것은 pUPX5, pUPX5013, pUPX5014가 IPTG에 의해 유도되지 않고 비슷하게 발현되며 끼여든 절편의 방향과 상관없이 비슷하게 발현된다는 점에서 vector의 *lac* promoter와는 무관하게 자체적으로 유전자의 발현을 조절할 수 있는 어떤 구조를 가지

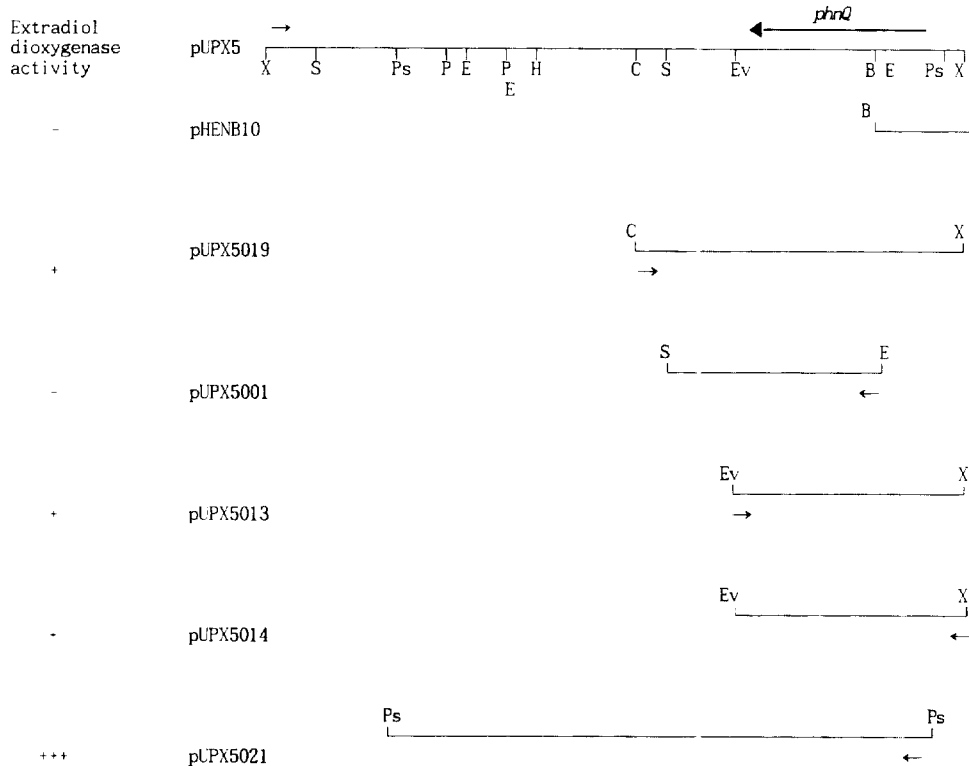


Fig. 3. Physical and genetic map of recombinant plasmid pUPX5 and its derivatives. The direction of transcription of the *lac* promoter is indicated as arrow heads. The extradiol activities of strains harboring the plasmids were determined by spraying 100 mM 2,3-dihydroxybiphenyl solution. Abbreviations: E, *Eco*RI; H, *Hind*III; B, *Bgl*III; C, *Cla*I; Ev, *Eco*RV; P, *Pst*I; S, *Sal*I; Ps, *Psp*1406I; X, *Xho*I.

**Table 2.** Substrate specificities of the PhnQ and PhnE extradiol dioxygenases

Substrates	Relative activity(%)	
	PhnQ	PhnE
Catechol	75.4	100.0
2,3-dihydroxybiphenyl	100.0	11.5

고 있다는 추측을 하게 한다. 더욱이 제한 효소 *Psp14061*을 이용하여 *XhoI* 위치에서 약 260 bp를 결실시킨 pUPX 5021을 IPTG로 유도하여 효소 활성을 측정하면 다른 것들보다 훨씬 높은 활성을 확인할 수 있었다. 그러므로 부분적인 염기 서열과 나타나는 효소 활성을 근거로 할 때 이 유전자는 이미 밝혀진 *phnE* 유전자와는 반대 방향으로 전사될 것이라고 생각한다(Fig. 1).

*phnQ* 유전자는 먼저 보고된 *phnE*와 약 7-kb 정도 떨어져서 서로 다른 방향으로 전사되고 있는 것이 특이적이다(Fig. 1). 지금까지 보고된 meta-cleavage dioxygenase들은 대부분 하나의 균주 내에 하나의 효소가 존재하는 것이 일반적이었다. 그러나 최근 *Sphingomonas yanoikuyae* B1이나 *Pseudomonas putida*의 NAH7 plasmid 등에서 기질 특이성이 상이한 두 종류의 효소가 존재하는 것이 보고되었다(5, 9). 특히 *Sphingomonas yanoikuyae* B1에서는 두 효소의 전사 방향이 서로 반대임이 밝혀졌으며, 이 두 유전자들도 DJ77에서와 마찬가지로 서로 약 7-kb 정도 떨어져서 존재한다고 보고되었다(9). 이러한 점에서 진화적 유연관계가 매우 흥미롭다.

#### 대장균에서 발현한 PhnQ 효소의 활성과 기질 특이성

*phnQ* 유전자를 포함하고 있는 pUPX5021을 이용하여 효소 활성을 측정하였다. 몰 흡광도 계수를 이용하여 효소의 활성을 계산한 결과 PhnQ의 2,3-dihydroxybiphenyl에 대한 활성을 100%라고 할 때 catechol에 대해서 75.4%의 활성을 보였다. 이 결과는 이미 보고된 PhnE가 catechol 2,3-dioxygenase로 catechol에 대한 활성을 100%라고 할 때 2,3-dihydroxybiphenyl에 대해 10% 미만의 낮은 활성을 보이는 것과는 다른 형태의 기질 특이성을 나타내었다(Table 2). 그러나 PhnQ의 2,3-dihydroxybiphenyl에 대한 활성은 PhnE가 2,3-dihydroxybiphenyl에 대해 나타내는 활성보다 높게 나타났고, 반면에 PhnE의 catechol에 대한 활성은 PhnQ의 catechol에 대한 활성보다 높게 나타났다.

PhnQ extradiol dioxygenase의 효소 활성을 측정한 결과, 다른 균주들에서 보고된(7) 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases보다 넓은 기질 특이성을 가진다. 또 이미 보고된 catechol 2,3-dioxygenase인 PhnE도 다른 균주들에서 밝혀진 것들보다는 좀 넓은 기질 특이성을 보였는데, 이것은 이 균주가 이용할 수 있는 기질이 다양하기 때문이라고 생각된다. 이처럼 PhnQ는 다른 그룹에서 보고한 것들과 유사한 구조를 가지는 전형적인 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases이지만, 효소 활성에서 나타나는 기질 특이성은 다른 것들과 비교되는 독특한 성질을 가지는 것으로 생각이 된다. 따라서 이 효소에 관해 좀더 자세한 연구가 진행되어야 할

것이다.

#### 감사의 말

이 연구는 교육부 기초과학 연구비(BSRI-95-4432)에 의해 수행되었습니다.

#### 참고문헌

- Bartilson, M. and V. Shingler. 1989. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene* **85**, 233-238.
- Bayly, R.C., S. Dagley and D.T. Gibson. 1966. The metabolism of cresols by species of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **101**, 293-301.
- Eltis, L.D., B. Hofmann, H.J. Hecht, H. Lunsdorf and K.N. Timmis. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 2727-2732.
- Han, S.G., L.D. Eltis, K.N. Timmis, S.W. Muchmore and J.T. Bolin. 1995. Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading *Pseudomonad*. *Science* **270**, 976-980.
- Harayama, S. and M. Rejik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Bacteriol.* **172**, 1160-1164.
- Hegeman, G.D. and C.F. Feist. 1969. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.* **100**, 869-877.
- Hirose, J., N. Kimura, A. Suyama, A. Kobayashi, S. Hayashida and K. Furukawa. 1994. Functional and structural relationship of various extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas* origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 273-278.
- Kim, C.K., J.W. Kim, Y.C. Kim and T.I. Mheen. 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. J. Microbiol.* **24**, 67-72.
- Kim, E. and G.J. Zylstra. 1995. Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J. Bacteriol.* **177**, 3095-3103.
- Kim, Y.C., K.S. Youn, M.S. Shin, H.S. Kim, M.S. Park and H.J. Park. 1992. Molecular cloning of a gene cluster for phenanthrene degradation from *Pseudomonas* sp. strain DJ77 and its expression in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 1-7.
- Kim, Y.C., M.S. Shin, K.S. Youn, Y.S. Park and U.H. Kim. 1992. Nucleotide sequence of *phnE* gene encoding extradiol dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 8-14.
- Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuga, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi and K. Yano. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* **171**, 2740-2747.

13. Lee, J., J. Oh, K.R. Min, C.K. Kim, K.H. Min, K.S. Lee, Y.C. Kim, J.Y. Lim and Y. Kim. 1996. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene encoded in chromosomal DNA of *Pseudomonas putida* KF715. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **224**, 831-836.
14. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
15. Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
16. Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki and K. Furukawa. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry* **27**, 3990-3996.
17. Zylstra, G.J. and D.T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J. Bacteriol.* **164**, 14940-14946.

(Received December 28, 1996/Accepted February 26, 1997)

---

**ABSTRACT: Cloning of *phnQ* Gene Encoding Extradiol Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. DJ77 and Its Expression in *Escherichia coli***

**Hee-Jung Shin, Yong-Chjun Park, Kyung-Hee Min<sup>1</sup>, Chi-Kyung Kim, Jai-Yun Lim and Young-Chang Kim\***(School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, <sup>1</sup>Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea)

We cloned the 5-kb *Xho*I fragment containing gene responsible for degradation of phenanthrene using pBLUES-CRIPT SK(+) vector and *E. coli* XL1-Blue strain from the genomic library of *Pseudomonas* sp. DJ77 and this recombinant plasmid was named pUPX5. The strain containing pUPX5 could produce a yellow *meta*-cleavage product using 2,3-dihydroxybiphenyl as a substrate. This strain have a higher activity toward 2,3-dihydroxybiphenyl than catechol. We subcloned and localized the gene encoding 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, which is designated as *phnQ*.