

Pseudomonas sp. Strain DJ77에서 Rieske-Type의 Ferredoxin을 암호화하는 *phnR* 유전자의 구조

김성재 · 박용춘 · 김치경 · 임재윤 · 이기성¹ · 민경희² · 김영창*
충북대학교 생명과학부, ¹배재대학교 생물학과, ²숙명여자대학교 생물학과

Nucleotide Sequence of the *phnR* Gene Encoding Rieske-Type Ferredoxin from *Pseudomonas* sp. Strain DJ77. Sungje Kim, Yong-Chjun Park, Chi-Kyung Kim, Jai-Yun Lim, Ki-Sung Lee¹, Kyung-Hee Min² and Young-Chang Kim*. School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, ¹Department of Biology, Pai-Chai University, Taejon 302-735, Korea, ²Department of Biology, Sookmyung Womens University, Seoul 140-742, Korea - One of the three components of the phenanthrene dioxygenase which is required for conversion of phenanthrene to *cis*-phenanthrene dihydrodiol, Rieske-type ferredoxin encoded by *phnR* has been cloned and sequenced from *Pseudomonas* sp. strain DJ77. The gene *phnR* is positioned at the downstream of *phnQ* encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. The PhnR ferredoxin contains 108 amino acids with a Mr of 11,355. The deduced amino acid sequence of the PhnR ferredoxin is 35-79% identical to those of homologous ferredoxins encoded by various genes.

미생물이 naphthalene, phenanthrene 등의 다고리 방향족 탄화수소를 분해할 때 가장 처음에 관여하는 효소는 Fig. 1에서 처럼 한 분자의 산소를 방향족핵에 넣어 *cis*-dihydrodiol의 형태로 만들어주는 ring-dihydroxylating dioxygenase이다(1). 이 효소는 두 개 혹은 세 개 정도의 단백질이 전자전달계(electron-transport chain)를 이루고 있는 다구조효소(multicomponent enzyme)인데(2) 이 중에서 전자를 기질에 직접 전달해주는 역할을 하는 것은 terminal oxygenase라고도 하는 철-황 단백질(iron-sulfur protein; ISP)이며, 대단위체 α 와 소단위체 β 로 구성되어 있다. 다른 구성요소인 ferredoxin과 reductase는 NADH로부터 전자를 받아 산화환원반응을 되풀이 하면서 terminal oxygenase에 전자를 전달해주는 역할을 한다(3-5).

dioxygenase에서 중간전자전달자로서 전자를 terminal dioxygenase로 전달하는 역할을 하는 ferredoxin은 terminal dioxygenase처럼 [2Fe-2S] 유형의 철-황 구조(iron-sulfur cluster)를 가지고 있는 분자량 12-15 kDa 정도의 산성단백질로 1몰당 2g의 철과 황을 함유하고 있다(5). ferredoxin은 한개의 전자를 수용하며(6), 전자를 terminal oxygenase 성분으로 전달해주는 것 외에 cytochrome c같은 다른 전자수용체를 환원시키기도 한다(7).

[2Fe-2S] 구조에는 두개의 구별되는 유형이 있다(8).

하나는 철-황 구조가 네개의 cysteine 잔기에 결합한 형태를 가진 chloroplast-type [2Fe-2S] ferredoxin이고(9), 다른 하나는 철-황 구조가 두개의 cysteine과 두개의 histidine 잔기에 결합해 있는 Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin이다(10, 11). chloroplast-type [2Fe-2S] ferredoxin과 Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin은 spectroscopy로 나타나는 특징도 각각 독특하다. 특이한 것은 이런 특징들과 상대적으로 chloroplast-type보다 높은 산화환원전위(redox potential) 때문에 dioxygenase의 ferredoxin [2Fe-2S] 구조는 pyrazon dioxygenase(12)

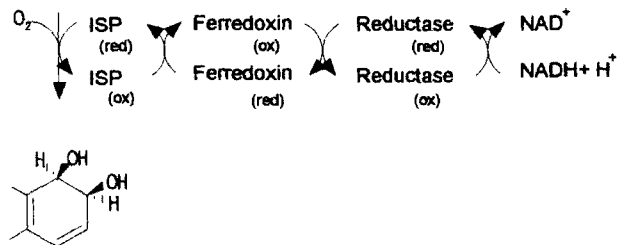


Fig. 1. Oxidation of polyaromatic hydrocarbon to *cis*-form dihydrodiol by ring-hydroxylating dioxygenase multienzyme complex.

Structural gene for ferredoxin component of phenanthrene dioxygenase of *Pseudomonas* sp. strain DJ77 is *phnR*. Electrons from NAD(P)H are transferred to ISP by reductase and ferredoxin. ISP then catalyzes the addition of molecular oxygen to the aromatic nucleus to form *cis*-form dihydrodiol. ox, oxidized; red, reduced.

*Corresponding author

Tel. 82-431-61-2302, Fax. 82-431-68-2538

E-mail: youngkim@cbuucc.chungbuk.ac.kr

Key words: *phnR* gene, Rieske-type ferredoxin, *Pseudomonas* sp. strain DJ77

를 제외하고 모두 Rieske-type의 철-황 단백질로 분류되었다(8).

지금까지 우리는 phenanthrene, benzene 등의 난분해성물질을 분해하는 *Pseudomonas* sp. strain DJ77(13)로부터 catechol을 분해하는 lower pathway에 관련된 유전자를 클로닝하였고, 여기서 catechol-2,3-dioxygenase 유전자 *phnE*, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase 유전자 *phnD*(Submitted), 그리고 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase 유전자 *phnG*를 확인하였다(14, 15). 그리고 전보(16)에서는 *phnE* 유전자부위에서 상류방향으로 5 kb정도 떨어진 부위에서 5 kb짜리 절편을 포함하는 pUPX5를 클로닝하여 여기에 upper pathway에 관련된 유전자중의 하나인 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase를 암호화하는 *phnQ*가 있음을 밝혔다. 계속되는 실험에서 우리는 *phnQ*의 3' 방향으로 ring-hydroxylating dioxygenase의 한 구성성분인 ferredoxin을 암호화하고 있는 *phnR*을 발견하였다. 이 논문에서는 *phnR*의 염기배열과 여기에서 유추한 아미노산배열의 상동성 분석을 통하여 이 유전자가 dioxygenase의 한 단위체인 Rieske-type의 ferredoxin을 암호화하고 있음을 보여주려 한다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 이미 보고한 바 있는 *Pseudomonas* sp. strain DJ77(13)을 사용하였다. 이전의 논문(16)에서 보고한대로 재조합 plasmid pUPX5는 pHENB10의 5' 말단부위를 탐침자로하여 DJ77의 phage library로부터 클로닝한 것이다. 그밖에 pUPX5001, pUPX5007, pUPX5008A, pUPX5008B, pUPX5009, pUPX

5013, pUPX5015 등의 subclone 등은 pUPX5로부터 제조하였다(Fig. 2). 형질 전환을 위한 숙주로는 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고, 클로닝 벡터로는 pBLUES-CRIPT SK(+) 혹은 KS(+) phagemid (Stratagene)를 사용하였다. 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. 완전 배지로는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하였다.

DNA 추출 및 조작

Plasmid DNA는 Sambrook (17)등의 방법에 따라 추출하였고, 각종 제한효소 및 T4 DNA ligase 등은 Boehringer Mannheim, POSCOCHEM(남도과학), 그리고 New England Biolab 등으로부터 구입하여 사용하였으며, 반응 조건은 제조 회사의 처방에 따랐다.

염기배열 결정과 분석

Applied Biosystems Automated DNA sequencer (Model 373A, Version 1.2.1)를 사용하여 염기배열을 결정하였다. 염기배열결정에 사용한 subclone들은 Table 1과 같고, plasmid DNA는 Qiagen Plasmid Elution Kit(Qiagen Co., Cat. No. 12125)를 사용하여 추출하였

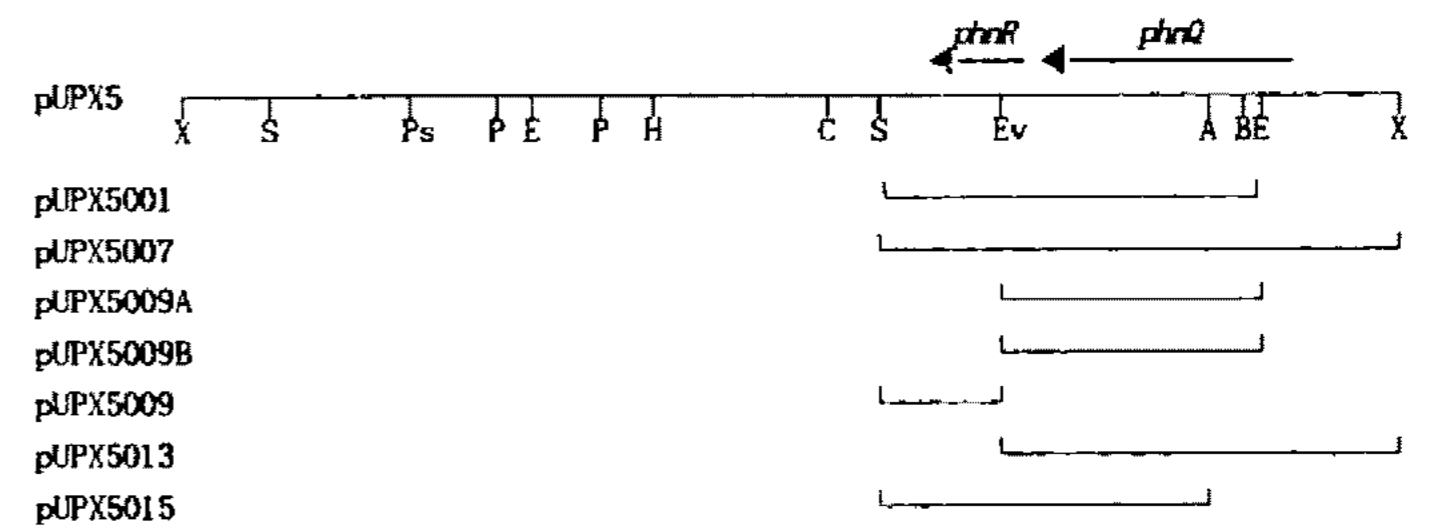


Fig. 2. Physical and genetic map of recombinant plasmid pUPX5 and its derivatives.

Abbreviations: A, *Aat*II; B, *Bgl*II; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; Ev, *Eco*RV; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I; Ps, *Psp*1406I; X, *Xho*I.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Descriptions	Sources
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ77	Growing with phenanthrene, 4-chlorobiphenyl and benzoate	13
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44hsdR17recA1endA1gyrA46thirelA1 Δ(lac proAB)</i> F[<i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ^f <i>lacZ</i> Δ M15Tn10(<i>tet</i>)]	
Plasmids		
pBluescript SK(+)	Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZα</i>	Stratagene 16
pHENB10	10 kb <i>Bgl</i> II fragment from DJ77 inserted into SK(+)	"
pUPX5	5 kb <i>Xho</i> I fragment from DJ77 phage library inserted into SK(+)	"
pUPX5001	1.3 kb <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5007	1.9 kb <i>Xho</i> I- <i>Sal</i> I fragment of pUPX5 in SK(+)	"
pUPX5008A	0.9 kb <i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RV fragment of pUPX5 in SK(+)	"
pUPX5008B	As above but with the insert in reverse orientation	"
pUPX5009	0.5 kb <i>Eco</i> RV- <i>Sal</i> I fragment of pUPX5 in SK(+)	"
pUPX5013	1.5 kb <i>Eco</i> RV- <i>Xho</i> I fragment of pUPX5 in SK(+)	16
pUPX5015	0.9 kb <i>Aat</i> II- <i>Sal</i> I fragment of pUPX5 in SK(+)	"

다. 염기배열과 아미노산배열은 DNASIS/PROSIS(Hitachi V7.06)를 사용하여 분석하였다. multiple alignment와 계통학적 분석은 Clustal V algorithm(18)을 통하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Rieske-Type ferredoxin 유전자 *phnR*의 위치

ferredoxin 유전자의 위치를 결정하기 위하여 pUPX 5의 제한효소지도를 바탕으로 여러 가지 subclone을 제조하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *phnR*은 전보(16)에서 효소활성을 밝힌 *phnQ*의 하류부위에 위치하고 있었다.

phnR 유전자의 구조

전보 (16)에서 이용한 pUPX5001, pUPX5013, pUPX

```

5' TTCCGCTGCTGTGACAATCTTCGTGTAATCAATTCTTGACAGGAAAACAACCCCATCAT 60
                                     phnR      M
GTCGAACCAATTGCGCCTTTGTGAAGTTGCCGGCGTAAAAGACGGCGAGCCGGTCCGGGC 120
S N Q L R L C E V A G V K D G E P V A A
GTTCCCGGAAGGAATGCCCGCCCTCGCAGTATATAATGTTGATGGCGAGATTTTCGTTAC 180
F A E G M P A L A V Y N V D G E I F V T
CGACAATCTTTGCACTCACGGCAATGCCATGCTGACCGACGGATATCAGGATGGCGACAT 240
D N L C T H G N A M L T D G Y Q D G D I
CATCGAGTGTCCGTTCCATGCGGCTCGTTCGACATCAAGACCGCGCAGCCAAGGCCCTT 300
I E C P F H G G S F D I K T G A A K A F
TCCCTGCCAAGTGGCGATCGCGTCCATCCGGTCGAAATCGAGGATGGTTGGGTCTGCAT 360
P C Q V A I A S Y P V E I E D G W V C I
CACGAAGCCCGAAGGAGCAGCCTGATGGGCCTTCCCACCCTTGAGCAGATGCAGTTTCAG 420
T K P E G A A *
    
```

Fig. 3. Nucleotide sequence of the *phnR* gene encoding Rieske-type ferredoxin component of phenanthrene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain DJ77 (GenBank accession number U92479).

A putative ribosome binding site is underlined. The amino acid sequences deduced from the nucleotide sequence are shown in one-letter code, and asterisks indicate stop codon.

Table 2. Homology of the deduced amino acid sequence of PhnR and the sequences of 25 ferredoxin reductases of dioxygenase systems

Ferredoxin	% Identity with																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1 PhnR	100	79.2	46.7	46.7	46.7	47.1	45.6	42.3	45.7	43.4	47.7	50.7	43.4	42.1	43.8	34.8	34.8	39.1	39.1	38.0	42.9	38.2	38.2	39.8	39.8	38.8
2 Ferre		100	48.9	48.9	48.9	45.6	46.6	44.7	42.3	44.0	49.4	52.2	44.0	45.3	44.0	34.7	34.7	39.8	39.8	39.1	43.7	37.6	37.6	39.8	39.8	40.4
3 DoxA			100	100	100	90.4	94.2	90.4	34.4	37.6	73.8	67.0	35.6	36.4	35.6	37.0	35.9	40.2	40.2	36.9	42.6	43.7	43.7	44.7	44.7	37.9
4 NdoA				100	100	90.4	94.2	90.4	34.4	37.6	73.8	67.0	35.6	36.4	35.6	37.0	35.9	40.2	40.2	36.9	42.6	43.7	43.7	44.7	44.7	37.9
5 NahAb					100	90.4	94.2	90.4	34.4	37.6	73.8	67.0	35.6	36.4	35.6	37.0	35.9	40.2	40.2	36.9	42.6	43.7	43.7	44.7	44.7	37.9
6 PahA2						100	92.3	89.4	35.2	36.4	76.7	70.9	35.4	34.3	34.3	35.2	34.1	41.3	41.3	40.9	42.6	43.1	43.1	43.5	43.5	37.9
7 NahAb							100	96.2	35.8	37.4	73.8	67.0	35.4	35.4	34.7	36.2	35.1	41.7	41.7	38.5	40.6	43.1	43.1	42.9	42.9	36.1
8 PahAb								100	37.4	36.4	72.8	65.0	35.4	34.3	34.3	36.3	35.2	43.5	43.5	39.8	40.8	43.1	43.1	42.6	43.6	34.7
9 BphA3									100	56.9	38.7	38.7	54.9	57.6	60.2	59.2	59.2	54.8	54.8	53.9	41.9	40.2	40.2	51.0	51.9	51.0
10 BedB										100	38.0	38.0	94.4	94.3	86.9	65.4	66.3	56.1	56.1	62.9	41.5	40.6	40.6	57.9	58.9	55.1
11 NtdAb											100	78.8	37.0	36.0	36.0	34.7	33.7	43.2	43.2	40.9	40.6	41.6	41.6	44.6	44.6	39.1
12 DntAb												100	37.0	36.0	37.0	40.5	39.2	36.8	36.8	38.7	35.6	41.6	41.6	37.6	37.6	35.5
13 TodB													100	98.1	88.8	68.3	67.3	59.8	59.8	58.2	42.1	40.6	40.6	55.1	56.1	55.1
14 BnzC														100	88.7	69.5	68.4	57.6	57.6	57.7	41.5	39.4	39.4	58.2	59.2	60.2
15 TcbAc															100	68.3	67.3	58.1	58.1	59.8	44.9	43.3	43.3	59.4	60.4	53.3
16 IpbA3																100	98.1	54.3	54.3	52.9	42.7	52.1	52.1	48.6	49.5	51.4
17 BphA3																	100	53.3	53.3	53.9	42.7	53.1	53.1	49.5	50.5	52.4
18 BphF																		100	100	72.9	45.5	45.4	45.4	77.1	78.0	74.3
19 BphA3																			100	72.9	45.5	45.4	45.4	77.1	78.0	74.3
20 BphA3																				100	50.5	47.5	47.5	72.0	72.9	68.8
21 CmtAd																					100	45.4	45.4	48.5	49.5	43.9
22 Orf106																						100	100	47.4	48.5	40.6
23 BphF																							100	47.4	48.5	40.6
24 IpbA3																								100	99.1	69.7
25 CumA3																									100	70.6
26 BphF																										100

2 From *Sphingomonas* BN6 (unpublished [GenBank accession number U65001]). 3 From *Pseudomonas* sp. strain C18 (19). 4 From *Pseudomonas* sp. strain NCIB9816 (20). 5 From *Pseudomonas* sp. strain NCIB9816 (21). 6 From *P. aeruginosa* strain PaK1 (unpublished [GenBank accession number D84146]). 7 From *P. putida* G7 (22). 8 From *P. putida* OUS82 (22). 9 From *Rhodococcus globerulus* P6 (23). 10 From *P. putida* ML2 (24). 11 From *Pseudomonas* sp. strain JS42 (25). 12 From *Burkholderia* sp. DNT (26). 13 From *P. putida* F1 (27). 14 From *P. putida* BE-81 (28). 15 From *Pseudomonas* sp. P51 (29, 30, 31). 16 From *Rhodococcus erythropolis* BD2 (unpublished [GenBank accession number U24277]). 17 From *Rhodococcus* sp. RHA1 (32). 18 From *Burkholderia cepacia* LB400 (33). 19 From *P. pseudoalcaligenes* KF707 (34). 20 From *Pseudomonas* sp. KKS102 (35, 36, 37). 21 From *P. putida* F1 (38). 22 From *E. coli* K-12 Kohara clone #431 (unpublished [GenBank accession number D90884]). 23 From *E. coli* K-12 MB1655 (unpublished [GenBank accession number U00096]). 24 From *Pseudomonas* sp. JR1 (39). 25 From *P. fluorescens* IP01 (40). 26 From *Comamonas testosteroni* B-356 (41).

5015 등과 Table 1에서 처럼 pUPX5007, pUPX5008A, pUPX5008B, pUPX5009 등의 여러 subclone을 이용하여 *phnR* 유전자가 위치하고 있는 지역을 sequencing하였다. Fig. 3에서 보는 것처럼 유전자 *phnR*은 개시코돈 ATG와 종결코돈 TGA를 가진 327 bp로 이루어진 open reading frame(ORF)이다. 리보솜 결합부위로 생각되는 염기서열(5'-AGGA-3')는 이 ORF의 개시코돈으로부터 13 bp 앞에 존재하였다. 이 ORF의 G+C 함량은 57.2%로 지금까지 *Pseudomonas* sp. DJ77에서 밝힌 catechol 2,3-dioxygenase 유전자 *phnE*(57.4%, 15)와 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase 유전자 *phnD*(60.5%, submitted), 그리고 *phnF*(67.1%, submitted) 등과 비슷하거나 조금 낮은 수준이었다. 이 ORF에서 유추한 아미노산은 108개이며 이들이 암호화하고 있는 단백질의 분

자량은 11,355 Da이었다.

PhnR의 상동성 비교와 기능

*phnR*의 염기서열을 blastx를 통하여 분석한 결과 상동성이 있는 것으로 분석된 것은 모두 여러 가지 다른 균주들에서 밝혀진 ring-hydroxylating dioxygenase의 ferredoxin이었다. 이 중에서 가장 높은 상동성이 있는 것은 *Sphingomonas* BN6의 naphthalenesulfonic acid dioxygenase의 ferredoxin 단위체(unpublished [GenBank accession number U65001])로서 아미노산서열을 비교하였을 때 79.2%로 비교적 낮았다. 그리고 *Pseudomonas* sp. strain C18의 DoxA (19), *Pseudomonas* sp. strain NCIB9816의 NdoA(20)와 NahAb(21) 등과는 46.7%의 상동성이 있었다. 그밖에 여러 ferredoxin의 아미노산서

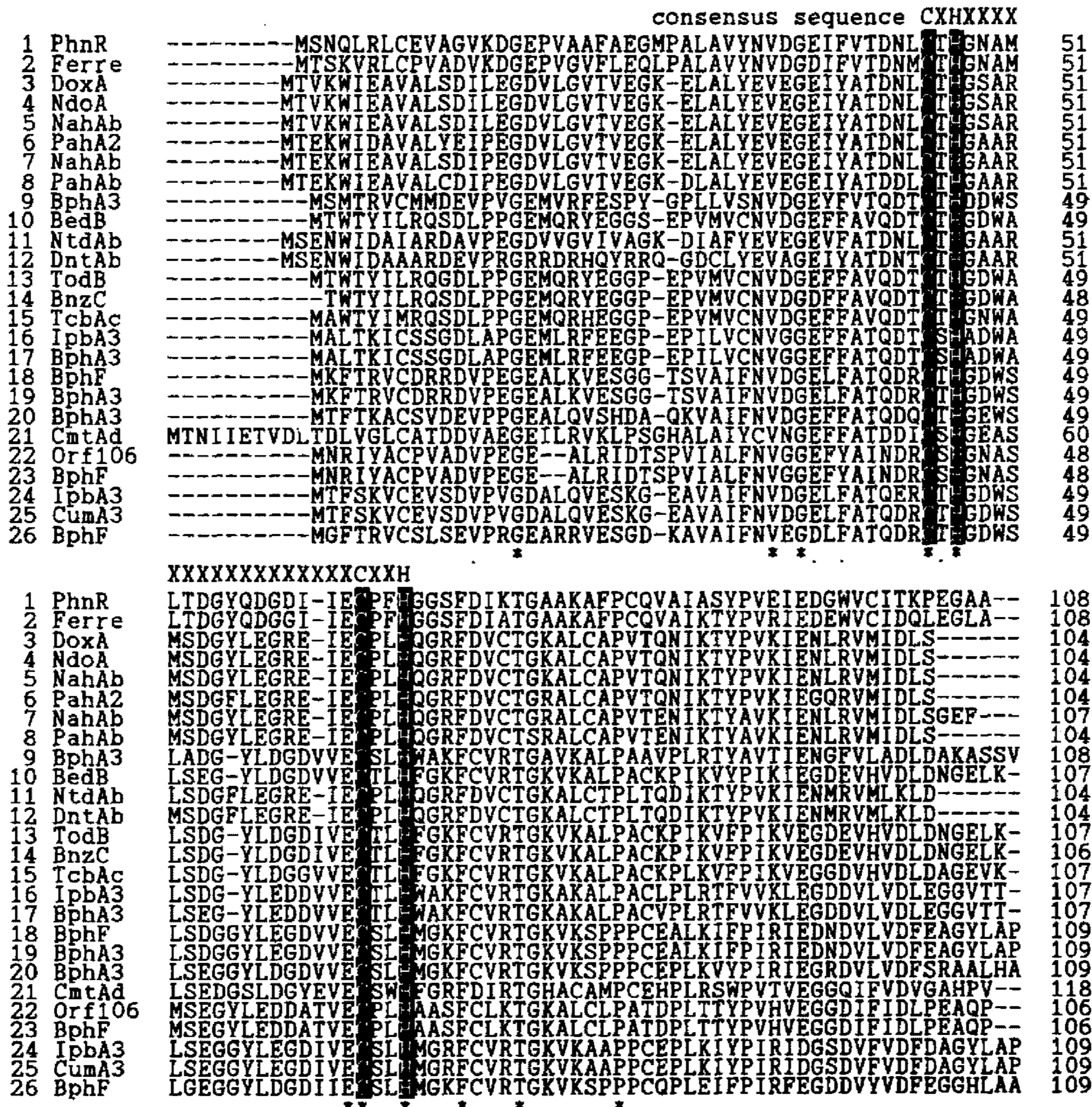


Fig. 4. Alignment of the deduced amino acid sequence of PhnR with the sequences of Rieske-type ferredoxin component of the ring-hydroxylating dioxygenases from the various sources.

Identical and similar amino acids are indicated by asterisks and dots, respectively. The consensus sequences of the motif involved in binding to the Rieske-type [2Fe-2S] cluster are shown above the amino acid sequences. The amino acid residues which match with the consensus sequences are in shaded (cf. Note in legend of Table 2).

결과 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Mason (10)등은 밝혀진 많은 Rieske-type ferredoxin의 아미노산 서열에서 공통된 부위, Cys-X-His-15~17 amino acids-Cys-X-X-His(X는 어느 아미노산도 가능한 자리)을 찾아내고 이를 Rieske-type [2Fe-2S] cluster의 결합에 관여하는 motif라고 하였다. Fig. 4에서 *phnR*의 염기서열에서 유추한 아미노산서열을 지금까지 밝혀진 25가지 ferredoxin의 아미노산서열과 비교한 결과를 보면, glycine, valine, cysteine, histidine, glutamate, phenylalanine, threonine, proline 등의 아미노산이 완전히 보존된 지역이 있으며, 위에서 언급한 motif 부위가 모두 나타나는 것을 볼 수가 있다. 이것은 PhnR이 Rieske-type의 ferredoxin이라는 것을 보여준다. 그리고 Fig. 5에서 보듯이 아미노산의 상동성을 50%를 기준으로 하여 ferredoxin을 다섯 개의 종류로 나누면, PhnR은 그중에서도 *Sphingomonas* sp. BN6의 ferredoxin 단위체와 한종류를 이루고 있는 것을 볼 수 있다.

Mason (10)은 여기서 단백질의 2차구조상에서 구부러지는 위치에 나타나는 glycine 잔기 한분자가 두 개의 histidine 잔기 바로 옆에 혹은 하나 건너서 자리하고 있는 것으로 미루어 [2Fe-2S] cluster가 단백질의 cleft에 위치하고 있는 것 같다고 분석하였다. Fig. 4에서 지금까지 밝혀진 26가지의 ferredoxin의 아미노산서열을 비교해보면 *E. coli* K-12 Kohara clone #431의 BphF와 *E. coli* K-12 MB1655의 Orf106, *Rhodococcus* sp. RHA1의 BphA3, *Rhodococcus erythropolis* BD2의 IpbA3, 그리고 *Rhodococcus globerulus* P6의 BphA3를 제외하면 모두 이

법칙이 적용되는 것을 확인할 수 있다.

지금까지 dioxygenase의 유전자구조에 대한 연구를 보면, Kiyohara 등이 *Pseudomonas putida* OUS82로부터 phenanthrene dioxygenase 유전자 *pahA*를 클로닝하여, 이 *pahA*가 각각 ferredoxin reductase, ferredoxin, 그리고 두 개의 철-황 단백질을 암호화하고 있는 *pahAa*, *pahAb*, *pahAc*, *pahAd* 등 네 개의 유전자로 구성되었음을 밝혔다(22, 42). 그리고 Ensley 등은 *Pseudomonas* sp. strain NCIB9816에서 naphthalene dioxygenase를 암호화하는 *nahA*를 클로닝하였다(2). 이들은 특히 이 다구조효소를 구성하는 세개의 단위체, reductase(4), ferredoxin(5), 철-황 단백질(3)을 모두 정제 분리하고 효소의 특성까지 밝혔다. 그밖에 biphenyl dioxygenase, toluene dioxygenase 등에서 오페론의 구조를 가지고 있는 여러 가지 dioxygenase 유전자들이 클로닝되었다(Fig. 4와 5의 설명 참조). 그러나 dioxygenase들은 넓은 기질특이성을 가지고 있어서(42-46) naphthalene을 분해할 수 있는 많은 *Pseudomonas* 종들을 보면 naphthalene 이외에도 phenanthrene이나 dibenzothiophene 등도 탄소원으로 이용한다(19-22).

Pseudomonas sp. strain DJ77은 phenanthrene과 biphenyl 등을 분해할 수 있는 세균으로 catechol을 분해하는데 관여하는 유전자들과 2,3-dihydroxybiphenyl을 분해하는 dioxygenase 유전자는 찾았지만(16), 아직까지 phenanthrene의 초기분해에 관여하는 ring-hydroxylating dioxygenase 유전자는 얻지 못하였다. 그러나 다른 세균들에서처럼 *Pseudomonas* sp. strain DJ77의 phenanthrene dioxygenase도 다구조효소일 것이며 *phnR*은 그중에서 ferredoxin 성분을 암호화하고 있는 것으로 추론할 수 있다.

요 약

phenanthrene을 *cis*-phenanthrene dihydrodiol 형태로 바꾸는데 관여하는 효소는 방향족고리에 두 개의 수산기를 붙이는 dioxygenase이다. phenanthrene과 biphenyl을 분해하는 능력이 있는 *Pseudomonas* sp. strain DJ77에서 클로닝한 재조합 플라스미드 pUPX5로부터 전보의 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase을 암호화하는 *phnQ*의 하류방향으로 327개의 open reading frame을 발견하였다. 이 ORF, PhnR을 분석한 결과 dioxygenase의 Rieske-type ferredoxin 성분을 암호화하고 있는 것으로 밝혀졌다. PhnR은 108개의 아미노산으로 구성되어 분자량 11355의 단백질을 만들어내며, *Sphingomonas* BN6의 naphthalenesulfonic acid dioxygenase ferredoxin 단위체와 79.2%의 상동성을 나타내었고, *Pseudomonas* sp. strain C18의 DoxA, *Pseudomonas* sp.

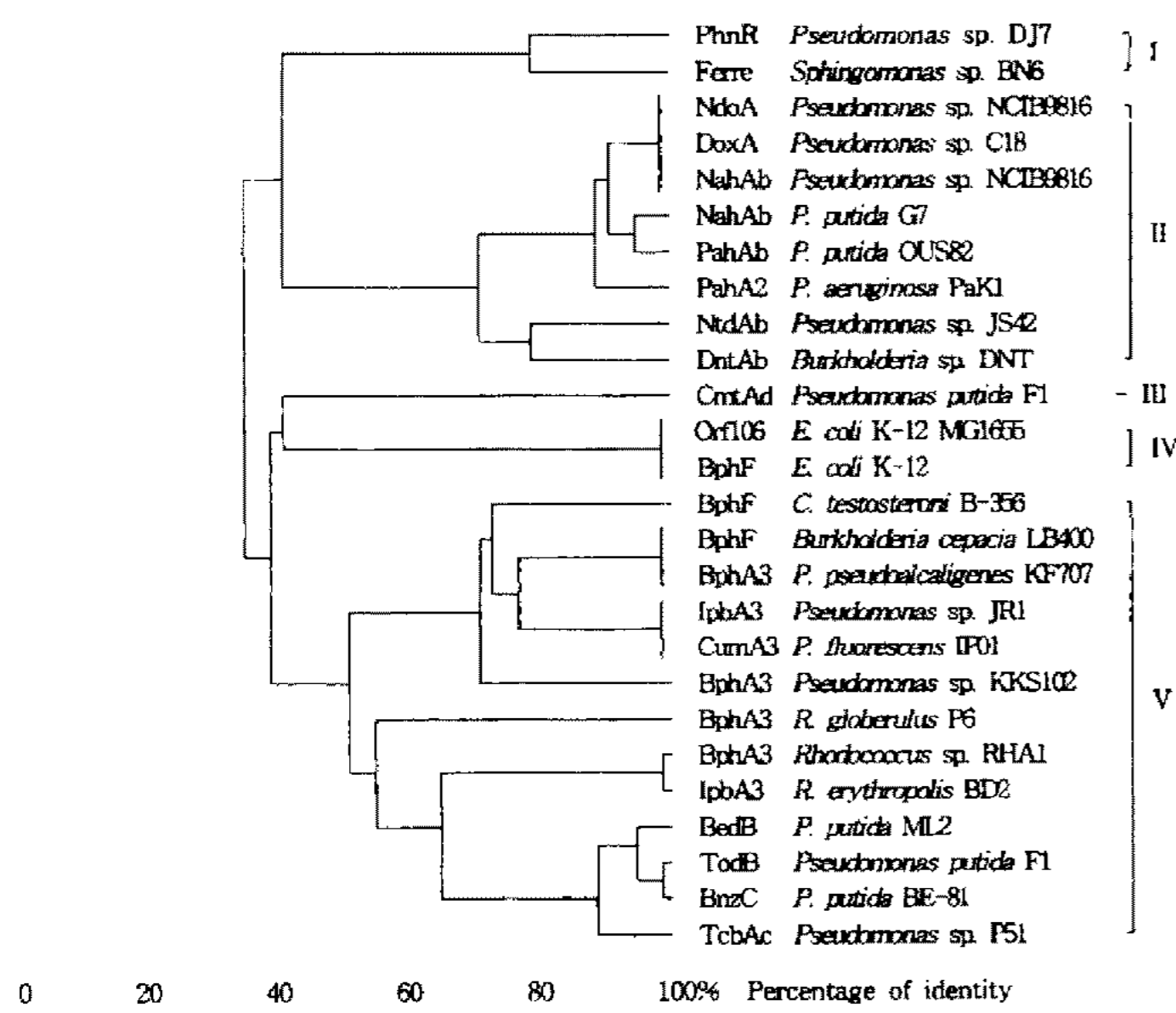


Fig. 5. Dendrogram showing the levels of homology between the amino acid sequences of different Rieske-type ferredoxin component of aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. The dendrogram was constructed with the ClustalV program (cf. Note in legend of Table 2).

strain NCIB9816의 NdoA와 NahAb 등과는 46.7%의 상동성을 보였다.

감사의 말

이 연구는 교육부 기초과학(BSRI-95-4432) 및 환경부와 과학기술처의 지원에 의한 환경공학기술개발사업(G-7 project)의 연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Jeffrey, A. M., H.J.C. Yeh, D. M. Jerina, T. R. Patel, J. F. Davey, and D. T. Gibson. 1975. Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **14**: 575-584.
- Ensley, B. D., D. T. Gibson and A. L. Laborde. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB9816. *J. Bacteriol.* **149**: 948-954.
- Ensley, B. D. and D. T. Gibson. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of a terminal oxygenase component. *J. Bacteriol.* **155**: 505-511.
- Haigler, B. E. and D. T. Gibson. 1990. Purification and Properties of NADH-FerredoxinNAP Reductase, a component of Naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* **172**: 457-464.
- Haigler, B. E. and D. T. Gibson. 1990. Purification and Properties of FerredoxinNAP, a component of Naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* **172**: 465-468.
- Crutcher, S. E. and P. J. Geary. 1979. Properties of the iron-sulfur proteins of the benzene dioxygenase system from *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* **177**: 393-400.
- Axcell, B. C. and P. J. Geary. 1975. Purification and some properties of a soluble benzene oxidizing system from a strain of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **146**: 173-183.
- Mason, J. R. and R. Cammack. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 277-305.
- Palmer, G. 1973. Current insights into the active center of spinach ferredoxin and other iron-sulphur proteins. *Iron-Sulphur Proteins*. Academic, New York.
- Fee, J. A., D. Kuila, M. W. Mather and T. Yoshida. 1986. Respiratory proteins from extremely thermophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **853**: 153.
- Gurbiel, R. J., C. J. Batic, M. Sivaraja, A. E. True and J. A. Fee. 1989. Electron nuclear double resonance spectroscopy of N-15-enriched phthalate dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* proves that 2 histidines are coordinated to the [2Fe-2S] Rieske-type clusters. *Biochemistry* **28**: 4861-71.
- Sauber, K., C. Frahner, G. Rosenberg, J. Eberspacher and F. Lingens. 1977. Purification and properties of pyrazon dioxygenase from pyrazon-degrading bacteria. *J. Biochem.* **74**: 89-97.
- 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, 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.
- Shin, H. J., Y. C. Kim. 1996. Cloning of *phnQ* Gene Encoding Extradiol Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain DJ77 and Its Expression in *Escherichia coli*. *미생물학회지*. 23권 1호. 투고중.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1990. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 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.
- Denome, S. A., D. C. Stanley, E. S. Olson and K. D. Young. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.* **175**: 6890-6901.
- Kurkela, S., H. Lehtv. slaiho, E. T. Palva and T. H. Teeri. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene* **73**: 355-362.
- Simon, M. J., T. D. Osslund, R. Saunders, B. D. Ensley, S. Suggs, A. Harcourt, W. Suen, D.L. Cruden, D.T. Gibson, and G.J. Zylstra. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4. *Gene* **127**: 31-37.
- Takizawa, N., N. Kaida, S. Torigoe, T. Moritani, T. Sawada, S. Satoh and H. Kiyohara. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* **176**: 2444-2449.
- Asturias, J. A., E. Diaz and K. N. Timmis. 1995. The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria *Gene* **156**: 11-18.
- Morrice, N., P. Geary, R. Cammack, A. Harris, F. Beg and A. Aitken. 1988. Primary structure of protein B from *Pseudomonas putida*, a member of a new class of 2Fe-2S ferredoxins. *FEBS Lett.* **231**: 336-340.
- Parales, J. V., A. Kumar, R. E. Parales and D. T. Gibson. 1996. Cloning and sequencing of the genes encoding 2-nitrotoluene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. JS42.

- Gene* **181**: 57-61.
26. Suen, W. C., B. E. Haigler and J. C. Spain. 1996. 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* **178**: 4926-4934.
 27. Zylstra, G. J. and D. T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **264**: 14940-14946.
 28. Irie, S., S. Doi, T. Yorifuji, M. Takagi and K. Yano. 1987. Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **169**: 5174-5179.
 29. Werlen, C., H. P. Kohler and J. R. van der Meer. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J. Biol. Chem.* **271**: 4009-4016.
 30. Van der Meer, J. R., A. J. Zehnder and W. M. de Vos. 1991. Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* **173**: 7077-7083.
 31. Van der Meer, J. R., A. R. van Neerven, E. J. de Vries, W. M. Vos and A. J. Zehnder. 1991. Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* **173**: 6-15.
 32. Masai, E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079-2085.
 33. Erickson, B. D., F. J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl -degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* **174**: 2903-2912.
 34. Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida and K. Furukawa. 1992. Analysis of bph operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* **267**: 4844-4853.
 35. Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, 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.
 36. Fukuda, M., Y. Yasukochi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi and K. Yano. 1994. Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strains KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 850-856.
 37. Kikuchi, Y., Y. Nagata, M. Hinata, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano and M. Takagi. 1994. Identification of the *bphA4* gene encoding ferredoxin reductase involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* **176**: 1689-1694.
 38. Eaton, R. W. 1996. *p*-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon. *J. Bacteriol.* **178**: 1351-1362.
 39. Pflugmacher, U., B. Averhoff and G. Gottschalk. 1996. Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of isopropylbenzen dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3967-3977.
 40. Aoki, H., T. Kimura, H. Habe, H. Yamane, T. Kodama and T. Omori. 1996. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of the genes encoding enzymes involved in the degradation of cumene to 2-Hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2, 4-dienoic acid in *Pseudomonas fluorescens* IPO1. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 187-196.
 41. Sylvestre, M., M. Sirois, Y. Hurtubise, J. Bergeron, D. Ahmad, F. Shareck, D. Barriault, I. Guillemette and J. M. Juteau. 1996. Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases. *Gene* **174**: 195-202.
 42. Kiyohara, H., S. Torigoe., N. Kaida., T. Asaki., T. Iida., 2H. Hayashi and N. Takizawa. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* **176**: 2439-2443.
 43. Yang, Y., R. F. Chen and M. P. Shiaris. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB9816. *J. Bacteriol.* **176**: 2158-2164.
 44. Zylstra, G. J., X. P. Wang, E. Kim and V. A. Didolkar. 1994. Cloning and analysis of the genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **721**: 386-398.
 45. Menn, F.-M., B. M. Applegate and G. S. Sayler. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1938-1942.
 46. Sanseverino, J., B. M. Applegate, J.M.H. King and G. S. Sayler. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1931-1937.

(Received 12 March 1997)