

Sphingomonas chungbukensis DJ77에 존재하는 Plasmid pSY1의 PAH 분해능

박승기 · 김성재² · 신희정 · 김영창^{1*}

충북대학교 생명과학부, ¹충북대학교 유전공학연구소, ²미국국립독성연구소

Sphingomonas chungbukensis DJ77에서 난분해성 물질 분해 유전자가 chromosome 또는 plasmid 존재하는지를 규명하였다. 야생주 DJ77의 plasmid를 mitomycin C를 이용하여 curing 시킨 후, 각각 phenanthrene과 biphenyl이 단일 탄소원으로 첨가된 최소배지에서 배양한 결과 야생주는 성장을 하지만 plasmid가 제거된 DJ77은 성장하지 않았다. 각각의 plasmid DNA를 분리한 후 이미 클로닝된 방향족 탄화수소 분해에 관련된 DNA probe로 하여 Southern hybridization을 한 결과 야생주에서만 positive signal을 발견할 수 있었다.

Key words □ PAH degradation, plasmid pSY1, *Sphingomonas chungbukensis* DJ77

농업과 산업분야, 그리고 일상생활에서 널리 이용되는 다양한 종류의 화학물질들은 이제는 그들이 환경에 미치는 영향 때문에 관심의 초점이 되고 있다. 특히 환경에 유입되는 화학물질 중에서 벤젠 고리를 가지고 있는 종류들은 물리화학적으로 안정되어 잘 분해되지 않으며 환경에 축적되는 성질을 가지고 있다. 이런 화합 물질로는 phenanthrene, anthracene, naphthalene 그리고 biphenyl 등의 다고리 방향족 탄화수소와 toluene, benzene, phenol 등의 단일 고리로 이루어진 방향족 탄화수소가 있다. 이 중에서 특히 3개의 benzene 고리로 구성된 phenanthrene과 같은 다고리 방향족 탄화수소들은 상당히 독성이 강하여 돌연변이 유발, 발암, 기형발생 등의 원인 물질이기 때문에, 더욱 심각한 환경 오염 문제를 일으킨다.

이러한 방향족 탄화수소를 분해하는 미생물들은 이미 많이 보고되어 있다. 미생물의 종도 *Pseudomonas* (4), *Burkholderia* (19), *Aeromonas*, *Mycobacterium* (6), *Sphingomonas* (9), *Rhodococcus*, *Novcardia* (17) 등의 세균과 몇몇 곰팡이에 이르기까지 매우 다양하다.

현재까지 방향족 탄화수소 오염물질의 분해에 대한 연구에서 특이한 것은 많은 경우 방향족 탄화수소의 분해에 관련된 유전자들이 큰 크기의 plasmid에 위치하고 있다는 사실이다. 잘 알려진 *Pseudomonas putida* mt-2의 TOL plasmid pWWO(5), *P. putida* NCIB9816의 NAH plasmid NAH7 (20), *P. putida* CF600의 pVII50 (1), *Sphingomonas* sp. HV3의 pSKY4 (21) 그리고 *S. aromaticivoran*의 plasmid pNL1 (16) 등이 그 예이다.

토양 미생물인 *Sphingomonas chungbukensis* DJ77은 biphenyl, phenanthrene 등 여러 가지 탄화수소를 단일 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있으며, 이 세균으로부터 탄화수소 분해대사에 관

여하는 4개의 유전자군(총 20 kb의 24개 유전자)과 다수의 효소가 보고되어 있다(10-14). 그러나 DJ77의 경우에는 그 분해 유전자가 chromosome에 존재하는지 plasmid에 존재하는지에 대한 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 mitomycin C를 이용하여 plasmid를 curing시키고 DJ77의 탄화수소 분해 유전자가 plasmid에 있다는 것을 밝히고자 했다.

재료 및 방법

실험균주와 시약

본 실험에 사용된 균주는 대전 공단지역 하폐수로부터 분리 보고된 *S. chungbukensis* DJ77과 이 야생주의 plasmid를 curing 시킨 cured strain DJ77-1, DJ77-2, DJ77-3이다. 본 실험에 사용된 tryptone, yeast extract, agar powder, NaCl 등의 배지 성분은 각각 Difco Laboratories (Detroit, Mich., U.S.A.), 동양화학 (Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, Curing agent로 사용한 mitomycin C와 Na₂HPO₄, KN₂PO₄, NH₄Cl, CaCl₂, MgSO₄ 7H₂O, Vitamine B1 (thiamine hydrochloride), glucose, phenanthrene, biphenyl, catechol 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다.

배지 및 배양조건

영양 배지는 Luria-Bertani (LB) 배지로 증류수 1 l에 tryptone 10 g, yeast extract 5 g 그리고 NaCl 5 g 되게 첨가하였고, 고체 배지는 agar를 1.5% 되게 첨가한 후 사용하였다. 그리고 최소 배지는 기본적으로 M9 salt (Na₂HPO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g/l)와 CaCl₂, MgSO₄ 7H₂O, Vitamine B1 (thiamine hydrochloride) 및 glucose를 0.5~1.5% 되도록 첨가한 M9 최소배지를 사용하였으며, 난분해성 물질의 분해여부를 확인하기 위해 M9 최소배지에 phenanthrene, biphenyl을 각각 도포한 M9 최소 선택

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

배지를 사용하였다.

DJ77의 최적배양온도는 30°C이며 호기성이기 때문에 액체배지에서는 진탕배양하였고, 고체배지에서는 단일 균집락을 도말한 후 30°C에서 48시간 배양하였다.

Plasmid의 Curing

DJ77의 난분해성 물질에 대한 분해 유전자가 plasmid에 존재하는지를 검토하기 위해 Horitsu 등(7)과 Miller(15)의 방법을 변형하여 실험하였다. 즉 LB 액체배지에서 하루 동안 진탕배양한 균액으로부터 10^4 cell을 취하여 10 ml의 LB 액체배지에서 지수기 말기까지 배양한 후 각각의 tube에 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 mitomycin C와 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 acridine orange를 첨가한 후 암실에서 24시간, 48시간으로 나누어 배양하였다. 균액을 적당히 희석하여 LB 고체배지에 도말한 다음 하룻 동안 배양하여 master plate로서 사용하였다. Master plate의 균집락을 멸균된 이쑤시개로 phenanthrene과 biphenyl이 각각 단일 탄소원으로 첨가된 지시배지와 LB 고체배지에 각각 이식하였다. 지시배지에서 성장하지 않는 균집락을 phenanthrene과 biphenyl의 분해능이 상실된 cured cell로서 선발하였다.

DJ77의 plasmid 추출

DJ77의 plasmid 추출은 Casse 등(2)의 방법과 Currier와 Nester(3)의 방법을 변형하여 사용하였다. 300 ml LB액체 배지에 균체를 배양 후 원심분리하여 균체를 회수하여 4 ml의 TE buffer로 현탁시켰다. 이것을 다시 원심분리하여 동일한 방법으로 TE buffer에 현탁시킨 후 76 ml의 alkaline lysing buffer(25°C에서 pH 12.45, 2.5% sodium dodecyl sulphate)를 넣고 90분 동안 100 rev.min⁻¹을 유지하여 교반한 후 37°C에서 25분간 방치하였다. 2 M Tris buffer(pH 7.0)를 첨가하여 pH를 8.5~9로 맞춘 후 2분동안 100 rev.min⁻¹로 교반하였으며, 그 후 5 M NaCl을 9.4 ml(전체 양의 10⁻¹ volume) 첨가하였다. 원심분리하여 상층액을 회수한 후 두 번 반복하여 동량의 phenol(3% NaCl 수용액에 포화된 phenol)을 넣은 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 동량의 phenol:chloroform과 chloroform 처리를 위와 동일한 방법으로 차례로 실행한 후 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol과 0.1 volume의 sodium acetate를 첨가하여 서서히 흔들었다. 6,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 침전물을 얻은 후 70% 냉 에탄올로 잘 씻은 후 에탄올을 완전히 증발시켰다. 침전물을 적당량의 TE buffer에 현탁하여 사용하였다.

Southern hybridization

Southern hybridization은 나일론 막과 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham) kit를 사용하여 수행하였다. Probe로는 dioxygenase의 terminal oxygenase 부분을 암호화하고 있는 유전자 *phnR*(12)의 upstream 부위를 가지고 있는 pYCS300을 사용하였다.

결과 및 고찰

Curing agent 처리 후 aromatic hydrocarbon 분해능의 유무

DJ77은 mitomycin C를 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 후 24시간 배양하고 방향족 탄화수소의 분해능 유무를 조사한 결과 분해능 상실한 균주를 찾을 수 있었다. Fig. 1b에서 볼 수 있는 것처럼 분해능 상실 균주와 야생주를 LB 고체배지에서 배양시켰을 때 균집락의 색깔, 모양 등은 일치함을 보였지만 성장능은 야생주에 비해 분해능 상실 균주가 월등하였다. 이것은 분해능 상실 균주에서 plasmid가 curing 되었음을 보여주는 것으로 plasmid가 curing 되면서 돌연변이주는 야생주에 비해 여분의 생체 에너지를 증식에 이용할 수 있기 때문으로 생각된다. 이러한 현상은 gram-negative 세균인 *Shigella* sp. 에서도 보고된 바 있다(18).

또한 catechol을 야생주와 방향족 탄화수소 분해능 상실 균집락에 떨어뜨린 결과 야생주에서는 catechol이 노란색으로 변하였지만 방향족 탄화수소 분해능 상실 균주에서는 색깔의 변화가 없었다(Fig. 1a). Catechol을 주었을 때 노란색으로 변한다는 것은 catechol 2,3-dioxygenase가 catechol을 2-hydroxymuconic semialdehyde로 변환시킨다는 의미이므로 야생주와 달리 돌연변이 세균은 catechol 2,3-dioxygenase activity를 가지고 있지 않다는 것을 말해준다. 이들을 phenanthrene과 biphenyl을 단일 탄소원으로 하는 M9 최소배지에서 배양시킨 결과 Fig. 1c와 Fig. 1d에서처럼 야생주는 배지상에 하얗게 도포된 phenanthrene을 분해시키면서 성장을 하였으며, 또한 biphenyl이 있는 배지에서는 노란색 균집락을 보이며 성장함을 확인할 수 있었으나 분해능이 상실된 균주는 전혀 성장하지 못하였다.

실제로 방향족 탄화수소 분해 유전자가 plasmid에 존재하는지를 확인하기 위해 야생주와 분해능 상실균주에서 large plasmid를 추출하였다. 추출된 plasmid DNA는 일반적인 전기영동에서는 염색체 DNA와 같은 위치에서 나타나므로 구별이 잘 되지 않아 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 통하여 야생주에는 존재하지만 cured strains에는 존재하지 않는 것을 확인하였다(data not shown). 좀 더 확실하게 확인하기 위하여 분리된 DNA를 제한효소인 *Xho*I로 처리한 후 Southern Hybridization을 시행하였다. Probe는 예전에 우리가 클로닝한 *phnR*(12) 유전자의 upstream 부분을 이용하였다. 그 결과 Fig. 2에서처럼 야생주에서만 signal이 나타났고 plasmid가 curing된 것으로 생각되는 DJ77-1과 DJ77-2에서는 signal이 보이지 않았다. DJ77-3에서도 역시 signal은 보이지 않았다(data not shown). 이것으로 보아 catechol 2,3-dioxygenase (13), 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase, 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (10), 2-hydroxy-pent-2,4-dienoate hydratase (11), acetaldehyde dehydrogenase, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase 등 그동안 우리가 밝혀온 난분해성 물질 분해 유전자가 plasmid에 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 PFGE를 이용하여 야생주와 분해능이 상실된 균주로부터 plasmid DNA의 pattern을 직접 비교하는데는 성공하지 못하였다.

본 연구는 *S. chungbukensis* DJ77에서 난분해성 물질 분해 유전자가 chromosome에 존재하는지 plasmid에 존재하는지를 밝히기 위하여 실시하였다. 많은 경우 방향족탄화수소 분해 유전자 같은 catabolic 유전자들은 plasmid에 위치하고 있다. 이는 자연계에서 유전자의 전이 가능성을 높여주는 방법으로 미

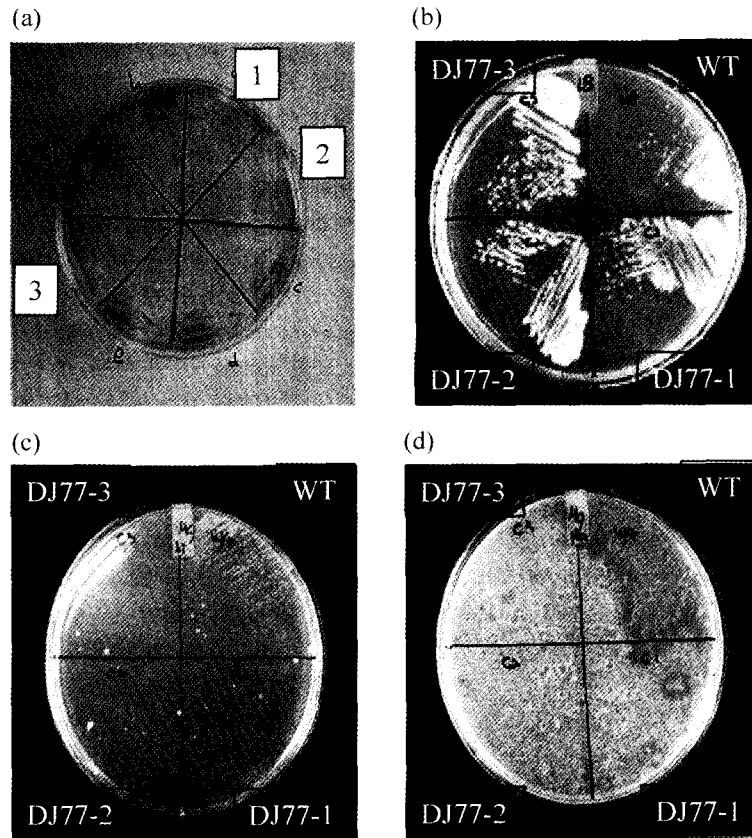


Fig. 1. Differences of growth mode between *Sphingomonas* sp. strain DJ77 and its cured cells. (a) Formation of yellow colonies in catechol-sprayed plates. Three colonies (1, 2, and 3) did not turn bright yellow when sprayed with 10 mM catechol. (b) Growth on LB medium. Wild type DJ77 showed delayed growth than cured strains. (c) Degradation of biphenyl, (d) Degradation of phenanthrene. The cured strains, DJ77-1, DJ77-2, and DJ77-3 were also failed to grow on the minimal medium sprayed with biphenyl or phenanthrene as a sole carbon and energy source.

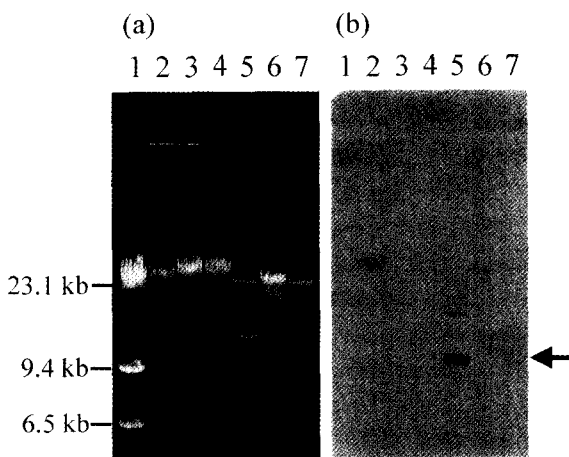


Fig. 2. Southern hybridization of DNA from DJ77 and its cured strains DJ77-1 and -2 with the *XhoI-SacII* fragment of pYCS300. (a) Agarose gel of DNA from DJ77 and its cured strains. Lanes: 1, Lambda *HindIII*-digested DNA; 2, DJ77 plasmid DNA; 3, cured strain DJ77-1; 4, cured strain DJ77-2; 5, *XhoI*-digested DJ77 plasmid DNA; 6-7, *XhoI* digested cured strains DJ77-1 and DJ77-2. (b) Corresponding Southern blot of (a) after hybridization with a labelled 2.2 kb *XhoI-SacII* fragment of pYCS300. Arrowheads indicate positions of the DNA fragments (13 kb) to which the probe hybridized.

생물의 생존에 유리하게 작용할 것이다. 특이한 것은 DJ77에서 지금까지 밝혀진 탄화수소 분해관련 유전자들과 *S. aromaticivorans* F199의 184 kb 짜리 mega plasmid pNL1에서 밝혀진 유전자와의 관계이다. 이 두 종에서 밝혀진 유전자는 그 상동성이 98% 이상 유사한 것으로 나타났다(8). 이 논문의 결과는 이런 유전자 사이의 상동성외에 DJ77도 F199와 마찬가지로 plasmid에 유전자가 위치하고 있다는 결과를 제시하는데, *S. aromaticivorans* F199가 미국의 Deep Subsurface에서 선별된 균주인 반면 *S. chungbukensis* DJ77 (9)은 대한민국 대전의 sediment에서 얻은 것임을 생각할 때 두 세균사이의 상동성이 매우 흥미롭다.

감사의 말

본 연구는 충북대학교 지방대 특성화 사업단의 산학협력연구 지원(98R-L-8)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Bartilson, M. and V. Shingler. 1989. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phe-

- nol-catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene* 85, 233-238.
2. Casse, F., C. Boucher, J.S. Julliot, M. Michel, and J. Denarie. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113, 229-242.
 3. Currier, T.C. and E.W. Nester. 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Analytical Biochem.* 76, 431-441.
 4. Ensley, B.D. and D.T. Gibson. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of a terminal oxygenase component. *J. Bacteriol.* 155, 505-511.
 5. Harayama, S. and M. Rejik. 1993. Comparison of the nucleotide sequences of the *meta*-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* with other *meta*-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution. *Mol. Gen. Genet.* 239, 81-89.
 6. Heitkamp, M.A., J.P. Freeman, D.W. Miller, C.E. Cerniglia Related Articles. 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl Environ Microbiol.* 54, 2556-65.
 7. Horitsu, H., Y. Kazumi, and F. Akira. 1986. Plasmid determined cadmium resistance in *Pseudomonas putida* GAM-1 isolated from soil. *J. Bacteriol.* 165, 334-335.
 8. Kim, Seong-Jae. 1999. Ph.D. thesis. Chungbuk national University. Cheongju. Korea
 9. Kim, S., J. 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. Sys. Env. Microbiol.* 50, 1641-1647.
 10. Kim, S.-J., H.-J. Shin, Y. Kim, S.J. Kim, and Y.C. Kim. 1997. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas* sp. DJ77 *phnG* gene encoding 2-hydroxyomuconic semialdehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 41-45.
 11. Kim, S.-J., O.K. Kweon, Y. Kim, C.K. Kim, K.S. Lee, and Y.C. Kim. 1997. Localization and sequence analysis of the *phnH* gene encoding 2-hydroxypent-2,4-dienoate hydratase in *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 56-60.
 12. Kim, S., Y.C. Park, C.K. Kim, J.Y. Kim, K.S. Lee, K.H. Min, and Y.C. Kim. 1997. Nucleotide sequence of the *phnR* gene encoding rieske-type ferredoxin from *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 367-373.
 13. Kim, Y.C., K.S. Youn, M.S. Shin, H.S. Kim, M.S. Park, and H.J. Park. 1992b. Molecular cloning of a gene cluster for phenanthrene degradation from *Pseudomonas* sp. DJ77 and its expression in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 30, 1-7.
 14. Kim, Y.C., M.S. Shin, K.S. Youn, Y.S. Park, and U.H. Kim. 1992a. Nucleotide sequence of the *phnE* gene encoding extradiol dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Kor. J. Microbiol.* 30, 8-14.
 15. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York.
 16. Romine, M.F., L.C. Stillwell, K.K. Wong, S.J. Thurston, E.C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J.K. Fredrickson, and J.D. Saffer. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181, 1585-1602.
 17. Saito, A., I. Tokuro, and Harayama S. 2000. Novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: Expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 2134-2141.
 18. Sasakawa, C., K. Kamata, T. Sakai, S.Y. Murayama, S. Makino, and M. Yoshikawa. 1986. Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 51, 470-475
 19. Shields, M.S., S.O. Montgomery, P.J. Chapman, S.M. Cuskey, and P.H. Pritchard. 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1624-1629.
 20. Yen, K.M. and I.C. Gunsalus. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 874-878.
 21. Yrjälä, K., L. Paulin, and M. Romantschuk. 1997. Novel organization of catechol meta-pathway genes in *Sphingomonas* sp. HV3 pSKY4 plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 403-408.

(Received May 2, 2001/Accepted May 31, 2001)

ABSTRACT: Attribution of PAH Degradation of *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 to the Plasmid pSY1

Seung-Kee Park, Seong-Jae Kim², Hee-Jung Shin, and Young-Chang Kim^{1*} (School of Life Sciences, Chungbuk National University, ¹Research Institute of Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763 and ²Microbiology Division, National Center for Toxicological Research, Jefferson, AR 72079, USA)

Sphingomonas chungbukensis DJ77 is able to use phenanthrene and biphenyl as the sole carbon and energy source. Mitomycin C curing experiment suggested that polyaromatic hydrocarbon (PAH) utilization in strain DJ77 was plasmid-encoded. The plasmid cured strains were failed to grow on the minimal medium sprayed with biphenyl or phenanthrene. This was evident from southern hybridizations using a previously cloned DNA segment as a probe. There were positive signals in the plasmid DNA of the wild-type strain DJ77 and the absence of hybridizations with chromosomal DNA from the plasmid-cured mutant strains.