

성장 온도가 *Rhodococcus* sp. Strain DK17의 Megaplasmid 안정성에 미치는 영향

김경선^{1†} · 김덕규^{2†} · 박혜연¹ · 성정희^{1#} · 김응빈^{1*}

¹연세대학교 생명시스템대학 생물학과, ²극지연구소 극지생명과학연구부

#현주소: 연세대학교 동서문제연구원

Heat Shock-Induced Physical Changes of Megaplasms in *Rhodococcus* sp. Strain DK17

Kyungsun Kim^{1†}, Dockyu Kim^{2†}, Haeyoun Park¹, Junghee Sung^{1#}, and Eunghin Kim^{1*}

¹Department of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, Republic of Korea

²Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Republic of Korea

*Present address: Institute of East & West Studies, Yonsei University

(Received December 22, 2010 / Accepted March 23, 2011)

Rhodococcus sp. strain DK17 possesses three megaplasms (380 kb pDK1, 330 kb pDK2, and 750 kb pDK3). The alkylbenzene-degrading genes (*akbABCDEF*) are present on pDK2 while the phthalate operons which are duplicated are present on both pDK2 (*ophA'B'C'R'*) and pDK3 (*ophABCR*). DK17 with an optimal temperature of 30°C showed no growth at 37°C. When transferred to 30°C, however, the 37°C culture began to grow immediately, indicating that 37°C is not lethal but stressful for DK17 growth. In addition, when exposed to 37°C even for a short time, a part of DK17 cells lost the ability to degrade *o*-xylene (a model compound of alkylbenzenes). When two hundred colonies were randomly selected for colony PCR for pDK2-specific *akbC*, *ophC'*, or pDK3-specific *ophC*, a total of 29 colonies were found to have lost at least one of the three genes. PFGE analysis clearly showed that all the mutants have different megaplasmid profiles from that of DK17 wild type, which are divided into five different cases: Type I (10 mutants, pDK2 loss and acquisition of a new ~700 kb plasmid), Type II (9 mutants, pDK2 loss), Type III (8 mutants, pDK3 loss and acquisition of a new ~400 kb plasmid), Type IV (1 mutant, pDK3 loss), and Type V (1 mutant, pDK2 and pDK3 loss and acquisition of the ~400 kb and ~700 kb plasmids). The above results showing that growth temperature changes can induce physical changes in bacterial genomes suggest that environmental changes in habitats including temperature fluctuations affect significantly the evolution of bacteria.

Keywords: *Rhodococcus*, heat-shock, megaplasmid, PFGE

*Rhizobium meliloti*에서 450 kb 이상의 거대한 plasmid가 발견되면서 이를 지칭하기 위해 'megaplasmid'라는 용어가 처음 사용된 이후로(22), 다양한 세균에서 megaplasmid의 존재가 확인되었다(2, 4, 9, 11). 특히 방향족탄화수소를 비롯한 유기화합물이나 인공합성물의 분해에 관여하는 유전자들이 megaplasmid에 존재하는 경우가 많은 것으로 보고되어 왔다(3, 8, 15, 18). 최근에는 *Rhodococcus* 속 세균들을 비롯하여 다양한 종류의 그람양성세균에서 catabolic megaplasmid가 발

견되었고(Table 1), 이미 상당 수의 염기서열이 보고되었다(1, 5, 13, 19, 20, 26).

대한민국 여천 석유화학공단의 유류 오염 토양에서 분리한 *Rhodococcus* sp. strain DK17은 *o*-xylene, ethylbenzene과 toluene 등 여러 종류의 alkylbenzene 뿐만 아니라 phthalate류도 성장기질로 이용할 수 있다(16). DK17의 방향족탄화수소 분해대사 유전자군은 3개의 linear catabolic megaplasmid (380 kb pDK1, 330 kb pDK2, 750 kb pDK3) 중 pDK2와 pDK3에 위치하는 것으로 확인되었다(7, 16). 즉, alkylbenzene 분해 유전자군(*akbABCDEF*)은 pDK2에, two copy로 존재하는 phthalate 분해 유전자군은 pDK2 (*ophA'B'C'R'*)와 pDK3

† These authors contributed equally to this work.

* For correspondence. E-mail: eunghin@yonsei.ac.kr; Tel: +82-2-2123-2651; Fax: +82-2-312-5657

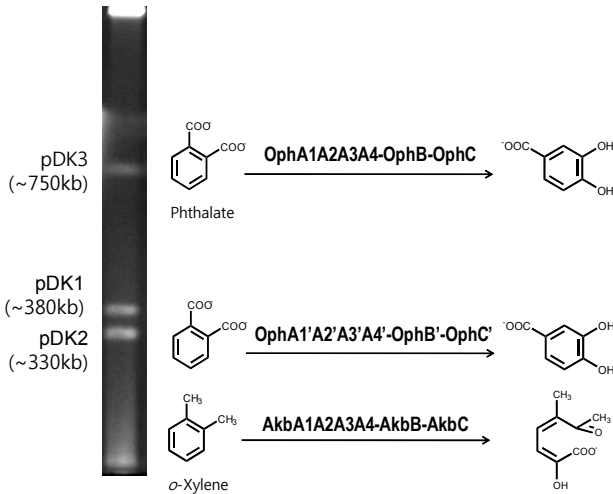


Fig. 1. PFGE separation of genomic DNA from *Rhodococcus* sp. DK17. The genes encoding the initial steps in alkylbenzene degradation are present on pDK2 while the phthalate operons are duplicated and are present on both pDK2 and pDK3.

(*ophABC*R)에 각각 위치한다(Fig. 1). 또한 pDK2는 자외선 조사에 의해서 상대적으로 쉽게 상실된다는 보고도 있었다(16). 여기에 DK17이 37°C에서는 전혀 성장하지 못한다는 사실(17)까지 함께 고려하면, 자연 환경에서 자외선 조사와 여름철 온도 상승 등이 DK17에게 주요한 물리적 스트레스로 작용할 수 있다는 추론이 가능해진다. 이 연구에서는 다양한 환경 스트레스가 DK17에 미치는 영향을 파악하기 위한 첫 단계로 성장온도가 DK17의 방향족탄화수소 대사와 megaplasmid 안정성에 미치는 영향을 조사분석하였다.

주변의 온도 상승에 의한 열충격이 DK17에 미치는 영향을 알아보기 위해서, DK17을 20 mM 포도당이 들어있는 mineral salt basal (MSB-glucose) 배지(25)에 접종한 후, 30°C에서 14-16시간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 MSB/glucose 배지에 현탁($OD_{600} \approx 0.1$)하였고, 10개의 microtiter plate well에 0.3 ml씩 분주하였다. BioscreenC machine (Oy Growth Curves AB Ltd., Finland)을 이용하여 DK17을 30°C

에서 5시간 동안 초기 지수성장기까지 배양($OD_{600} \approx 0.2$)한 후, 온도를 37°C로 높이고 50분(30°C에서 DK17의 doubling time) 동안 배양함으로써 열충격을 유도하였다. 열충격을 받은 10개의 배양액을 MSB 배지에 적절히 희석하여 MSB/glucose 고체 배지에 도달한 다음, 30°C에서 2일 동안 정치배양하였다. 열충격이 DK17의 alkylbenzenes 분해 능력에 미치는 영향에 대한 1차 조사로, 고체배지에서 성장한 집락들 중에서 무작위로 200개를 선택하여 멸균한 이쭉시개를 이용하여 각각의 집락을 3종류의 고체배지[MSB, MSB-phthalate (5 mM), MSB-glucose (20 mM)]에 접종하였다. 접종된 MSB 고체배지는 밀봉된 플라스틱 통에 넣고 *o*-xylene을 기체 형태로 공급하였다. 30°C에서 3일 동안 정치배양하면서 관찰한 결과, MSB-phthalate와 MSB-glucose 배지에서는 접종한 모든 집락이 성장하였으나, *o*-xylene을 공급한 MSB 배지에서는 총 9개(4.5%)의 집락이 성장하지 못하였다. 37°C 열충격 없이 배양한 대조군에서 선택한 200개의 집락은 *o*-xylene에서 모두 정상적인 성장을 보였기 때문에 위의 결과는 열충격 받은 DK17의 일부 세포가 *o*-xylene 분해 능력에 손상을 받았으며, 나아가서 자외선 조사의 경우와 마찬가지로 *o*-xylene 분해 관련 유전자군이 위치한 pDK2가 소실되었을 가능성까지 암시한다.

열충격이 DK17에 미치는 영향을 유전자 수준에서 알아보기 위하여, pDK2에 위치하는 *akbC*와 *ophC'* 그리고 pDK3에 위치하는 *ophC*의 소실 여부를 조사하였다. 위에서 무작위로 선발한 200개 집락으로부터 i-genomic DNA Extraction Mini kit (iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 genomic DNA를 뽑아서 PCR의 주형 DNA로 사용하였다. pDK2 특이 유전자인 *akbC* 및 *ophC'*와 pDK3 특이 유전자인 *ophC*의 증폭에 사용한 프라이머의 염기서열은 다음과 같다. *akbC*-F (5'-ATGGC AAAAGTGACCGAA C-3'); *akbC*-R (5'-TTATGCGGGGAT GTCGAG-3'); *ophC'*-F (5'-CAAATCGCCGATG-3'); *ophC'*-R (5'-CTATACCGTCGCTGCGC-3'); *ophC*-F (5'-CAGAGTCT CCCCTG-3'); *ophC*-R (5'-CTATACCGTCGCTGCGC-3'). PCR 반응은 ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma, USA)을 이용하여 PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA)로 수행하였다. DK17 genomic DNA 100 ng, forward/reverse 프라이머 (10 pmol/ μ l) 각 1 μ l, 2 \times Taq premix 10 μ l,

Table 1. Selected Gram-positive bacterial strains and their organic compound-degradative plasmids

Strain	Plasmid (size in kb)	Compounds	Shape	Reference
<i>Arthrobacter nicotinovor</i>	pAO1 (165)	Nicotine	Circular	12
<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	pTC1 (408)	Atrazine/Isopropylamine	Circular	20
	pTC2 (300)	Isopropylamine	Circular	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2	pBD2 (210)	Isopropylbenzene	Linear	26
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	pRHL1 (1,123)	Biphenyl/Phthalates	Linear	24
	pRHL2 (442)	Phthalates	Linear	
<i>Rhodococcus</i> sp. DK17	pDK2 (330)	Alkylbenzenes/Phthalate	Linear	7, 16
	pDK3 (750)	Phthalate	Linear	
<i>Gordonia westfalica</i> Kb1	pKB1 (101)	<i>cis</i> -1,4-Polyisoprene	Circular	5
<i>Gordonia</i> sp. KTR9	pGKT2 (182)	Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine	Circular	13

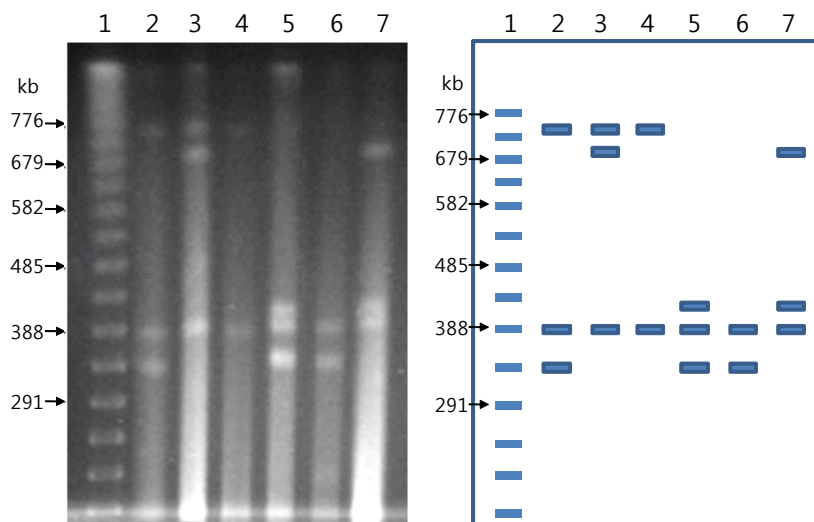


Fig. 2. PFGE separation of genomic DNAs prepared from the wild-type and the heat-shocked DK17 strains. Left and right panels show a photo of the PFGE gel and its drawing version, respectively. Lanes: 1, λ ladder standard; 2, the wild-type DK17; 3, Type I mutant (loss of pDK2 and acquisition of a new ~700 kb plasmid); 4, Type II mutant (loss of pDK2); 5, Type III mutant (loss of pDK3 and acquisition of a new ~400 kb plasmid); 6, Type IV mutant (loss of pDK3); 7, Type V mutant (loss of both pDK2 and pDK3 and acquisition of a ~400 kb and ~700 kb plasmids, respectively).

그리고 멸균 증류수 7 μ l을 혼합한 후, 95°C-10분; 95°C-30초, 55°C-30초, 72°C-1분, 30 cycles; 72°C-10분 PCR 반응조건을 사용하였다. PCR 산물은 0.5 \times TAE 완충액(1 \times TAE: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)과 0.7% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 그 결과, 총 29개의 집락에서 *akbC*, *ophC'* 그리고 *ophC* 유전자들 중에서 적어도 하나가 증폭되지 않음이 확인되었다. 구체적으로, *akbC*와 *ophC'*가 모두 증폭되지 않은 집락이 9개였고, 각각 *ophC'*과 *ophC*만 증폭되지 않은 집락이 11개와 9개였다. 결론적으로 무작위로 선택한 200개의 집락 중 최소한 14.5%에서 열충격에 의해 유전자 수준에서 변화가 일어났음을 알 수 있었다.

열충격이 DK17의 megaplasmid에 어떤 영향을 주었는지 조사하기 위해서, Saeki 등(23)의 방법을 조금 변형한 pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 방법으로 위의 29개 돌연변이체들의 유전체를 분석하였다. DK17 돌연변이체를 glucose (1%, w/v)와 glycine (1%, w/v)이 들어있는 LB 액체배지에 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 EET 완충액(0.1 M EDTA, 10 mM ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁한 후에, low-melting point agarose (2%, w/v)와 혼합하여 실온에서 굳혔다. Lysozyme (2 mg/ml), proteinase K (2 mg/ml), 그리고 sodium *N*-lauroyl-sarcosine (0.5 mg/ml)이 첨가된 TE 완충액(50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA; pH 8.0)에 plug를 넣고 30°C에서 48시간 동안 반응시킨 후, SDS (1%, w/v)가 포함된 EET 완충액으로 옮기고 55°C에서 12시간 동안 더 반응시켰다. Plug는 최종적으로 TE 완충액을 이용하여 3번 씻어주고 같은 완충액에 넣은 상태로 4°C에 보관하였다. PFGE는 0.5 \times TBE 완충액(1 \times

TBE: 89 mM Tris borate, 2.5 mM EDTA, pH 8.0)과 PFGE 용 agarose gel (1.0%, w/v)를 사용하여, Bio-Rad Laboratories CHEF-DR III system에서 수행하였다. Pulse duration을 총 16 시간 동안 15초에서 60초로 증가시키면서 14°C에서 6 V/cm로 전기영동을 실시하였다. PFGE 후 DK17의 megaplasmid 존재 유무와 상대적인 크기를 비교 분석한 결과, 29개의 돌연변이체들 모두 야생형과 다른 양상을 보였는데, 크게 5가지 유형(type I-V)으로 분류할 수 있었다.

pDK2가 상실되고 새로운 megaplasmid (~700 kb)가 출현한 10개의 돌연변이체들을 Type I (Fig. 2, lane 2)으로 분류하였다. 흥미로운 사실은 Type I 돌연변이체들의 genomic DNA를 주형으로 사용한 PCR 테스트에서 *ophC'*은 증폭되지 않았지만 *akbC*가 증폭되었고 Type I 돌연변이체들이 *o*-xylene에서 정상적으로 성장할 수 있다는 것이다. 이는 pDK2는 사라졌지만 pDK2에 위치하는 alkylbenzenes 분해 유전자군은 여전히 존재하고 있음을 의미한다. 실제로 새로 출현한 약 700 kb 크기의 megaplasmid를 분리하여 PCR 반응의 주형으로 사용하면 *akbC*가 증폭되기 때문에 alkylbenzenes 분해 유전자군이 다른 DNA 조각과 재배열을 일으켜서 새로운 megaplasmid를 형성한 것으로 추측된다.

Type II에는 pDK2를 상실한 9개(4.5%)의 돌연변이체들이 포함되는데(Fig. 2, lane 3), pDK2의 상실로 인해 *ophC'*와 *akbC*가 증폭되지 않았으며 *o*-xylene에서 성장하지 못했다. 또한 MSB-phthalate (5 mM) 액체배지에서는 DK17보다 성장도가 50% 정도로 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 pDK2와 pDK3에 존재하는 two copy의 phthalate 분해 유전자군들 중에서 pDK3에 있는 것만 기능을 발휘했기 때문이라고 생각된다. 실제로 phthalate 대사에 두 개의 분해 유전자군이 모두 관

여하는 것으로 밝혀져 있다(6).

Type III에는 pDK3가 상실되고 약 400 kb 크기의 megaplasmid가 출현한 8개(4%) 돌연변이체들이 포함되는데(Fig. 2, lane 4), pDK3의 DNA 일부분이 재배열 과정 중에 제거되어 작은 크기의 플라스미드를 형성한 것으로 추측된다. Type IV는 pDK3를 상실한 1개(0.5%)의 돌연변이체이다(Fig. 2, lane 5). 마지막으로 Type V는 pDK2와 pDK3를 상실하였으나 2개의 새로운 megaplasmid (각각 약 700 kb와 400 kb)가 출현한 1개(0.5%)의 돌연변이체인데(Fig. 2, lane 6), Type I과 Type III의 두 유형이 합쳐진 것으로 보인다.

단세포 생물인 세균에서 세포분열은 곧 개체증식을 의미하기 때문에 세포 분열 시 염색체뿐만 아니라 catabolic megaplasmid와 같은 부가 replicon을 온전히 복제하여 분할하는 것은 해당 세균의 적응도(fitness) 유지 및 향상에 매우 중요하다. 일반적으로 세균의 세포 분열 시, ParABS system이 plasmid 분할에 관여하는 것으로 알려져 있다(10, 14). ParABS system의 작동 메커니즘은 중심체 유사 부위(centromere-like site)인 *parS* 부위에 ParB 단백질이 결합하여 복제된 plasmid를 병렬시킨 다음, ATPase 기능을 가진 ParA 단백질이 plasmid 쌍을 분리시켜 세포 양극으로 이동시키는 방식이다.

Biphenyl 분해 세균인 *Rhodococcus* sp. strain RHA1은 3개의 megaplasmid (~1,123 kb pRHL1, ~442 kb pRHL2, ~332 kb pRHL3)를 가지고 있는데, DK17 경우와 마찬가지로 pRHL1과 pRHL2에 각각 하나씩 동일한 phthalate 유전자군이 중복되어 존재하고 있다(19). RHA1의 유전체 분석 결과 이 세균도 replicon 분할에 ParABS system을 이용하는 것으로 판명되었고, 이와 함께 몇 가지 흥미로운 사실이 발견되었다. 첫째, RHA1의 3개 megaplasmid 모두 *parA*와 *parS*는 가지고 있지만, *parB*는 염색체와 pRHL1에만 존재한다. 둘째, pRHL2는 *rep* homolog도 없기 때문에 다른 replicon으로 부터 이 기능을 지원받아야만 한다. 셋째, streptomycete 염색체에서 발견된 telomere 결합 단백질 유전자의 distant homologs인 *tpg*와 *tap* 유전자가 RHA1의 염색체에는 존재하지 않고 오히려 3개 megaplasmid 모두가 이 두 유전자를 가지고 있다. 따라서 RHA1의 각 replicon이 제대로 분할되기 위해서는 상호 의존이 불가피할 뿐만 아니라, 이런 상호의존이 replicon을 안정적으로 유지하는 데에도 기여할 것으로 추측된다. RHA1을 대상으로 한 curing 실험에서 pRHL2 또는 pRHL3가 제거된 돌연변이체의 제작은 가능했지만 megaplasmid 3개가 모두 손실된 돌연변이체 제작은 불가능했다는 사실이 이런 추론을 뒷받침한다(19). 또한 *Streptomyces hygroscopicus* strain 10-22에 존재하는 약 70 kb 크기의 linear plasmid도 28°C에서는 안정적으로 유지되나 37°C에서는 쉽게 손실된다는 보고가 있었는데, 이 논문의 저자들은 해당 plasmid 복제에 관여하는 특정 단백질이 온도 상승에 의해 활성을 상실했기 때문이라 추정하였다(21).

현재까지 분석된 DK17의 방향족탄화수소 분해유전자군의 염기서열이 RHA1의 해당 유전자군과 매우 유사하고(>95%) DK17과 RHA1모두 3개의 megaplasmid를 가지고 있다. 이런

사실에 비추어 볼 때, 이번 연구에서 조사한 200개의 열충격 처리 DK17에서 pDK1이 손실된 균체는 발견되지 않았고 온도 상승에 의해서 megaplasmid 전체가 소실되거나 일부만이 결손되는 경향이 pDK3보다 pDK2에서 더 크다는 실험 결과는 DK17의 megaplasmid 복제 및 분할에도 replicon간의 상호의존이 중요하다는 가능성을 시사한다. 그러나 이에 대한 정확하고 구체적인 해답을 얻기 위해서는 DK17과 megaplasmid 돌연변이체를 대상으로 한 심도 있는 비교 유전체학 연구가 필요하다. 결론적으로 온도 변화라는 단일 요인에 의해 catabolic megaplasmid와 같은 중요한 replicon에서 물리적인 변화가 유발된다는 사실을 명확하게 보여주는 이 논문의 연구 결과는 물리적 환경 변화가 세균의 유전체를 직접적으로 변화시켜 세균 진화에 상당한 영향력을 가지고 있음을 입증하는 증거로서 중요한 의미가 있다.

적요

Rhodococcus sp. strain DK17은 3개의 linear catabolic megaplasmid (380 kb pDK1, 330 kb pDK2, 750 kb pDK3)를 보유하고 있다. Alkylbenzene 분해 유전자군(*akbABCDEF*)은 pDK2에만 위치하는 반면 phthalate 분해 유전자군의 경우에는 거의 동일한 copy가 pDK2 (*ophA'B'C'R*)와 pDK3 (*ophABCR*)에 각각 위치한다. DK17은 최적 성장온도인 30°C에서 37°C로 배양온도를 상승시키면 성장이 멈추지만 30°C로 환원 즉시 다시 성장을 시작하였다. 이는 37°C라는 온도 조건이 DK17에게 치명적이지는 않지만 스트레스로 작용함을 암시하는 것이다. 또한 37°C에서 열충격을 받은 일부 세포는 *o*-xylene (alkylbenzene의 모델 화합물)을 분해 능력을 상실하였다. 열충격 후 200개의 집락을 무작위로 선택하여 pDK2- 또는 pDK3-specific 프라이머를 이용한 PCR과 pulsed-field gel electrophoresis를 통해 megaplasmid의 변화 양상을 비교 분석한 결과, 29개 돌연변이체에서 야생형의 것과 다른 5가지 megaplasmid 유형[pDK2 소실과 함께 새로운 약 700 kb megaplasmid 출현(10개), pDK2만 소실(9개), pDK3 소실과 함께 새로운 약 400 kb megaplasmid 출현(8개), pDK3만 소실(1개), 그리고 pDK2와 pDK3 소실과 함께 각각 약 400 kb와 700 kb 크기의 새로운 megaplasmid 출현(1개)]이 관찰되었다. 이상의 연구 결과는 성장 온도 변화가 세균 유전체의 물리적 변화를 직접 유도할 수 있음을 입증하는 것으로 온도 변화를 비롯한 서식지 환경 변화가 세균 진화에 상당한 영향력을 미칠 수 있음을 보여준다.

감사의 말

본 연구는 극지연구소 지원(PE10050, PE11060)과 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원(2011-0001111)을 받아 수행되었음.

참고문헌

- Baitsch, D., C. Sandu, R. Brandsch, and G.L. Igloi. 2001. Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase. *J. Bacteriol.* 183, 5262-5267.
- Banfalvi, Z., E. Kondorosi, and A. Kondorosi. 1985. *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. *Plasmid* 13, 129-138.
- Barton, B.M., G.P. Harding, and A.J. Zuccarelli. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226, 235-240.
- Basta, T., A. Keck, J. Klein, and A. Stolz. 2004. Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *J. Bacteriol.* 186, 3862-3872.
- Bröker, D., M. Arenskötter, A. Legatzki, D.H. Nies, and A. Steinbüchel. 2004. Characterization of the 101-kilobase-pair megaplasmid pKB1, isolated from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* Kb1. *J. Bacteriol.* 186, 212-225.
- Choi, K.Y., D. Kim, J.C. Chae, G.J. Zylstra, and E. Kim. 2007. Requirement of duplicated operons for maximal metabolism of phthalate by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 766-771.
- Choi, K.Y., D. Kim, W.J. Sul, J.C. Chae, G.J. Zylstra, Y.M. Kim, and E. Kim. 2005. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 207-213.
- Danko, A.S., M. Luo, C.E. Bagwell, R.L. Brigmon, and D.L. Freedman. 2004. Involvement of linear plasmids in aerobic biodegradation of vinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6092-6097.
- Dib, J.R., M. Wagenknecht, R.T. Hill, M.E. Farias, and F. Meinhardt. 2010. Novel linear megaplasmid from *Brevibacterium* sp. isolated from extreme environment. *J. Basic Microbiol.* 50, 280-284.
- Hiraga, S. 2000. Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 21-59.
- Hogrefe, C. and B. Friedrich. 1984. Isolation and characterization of megaplasmid DNA from lithoautotrophic bacteria. *Plasmid* 12, 161-169.
- Igloi, G.L. and R. Brandsch. 2003. Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *J. Bacteriol.* 185, 1976-1986.
- Indest, K.J., C.M. Jung, H. Chen, D. Hancock, C. Florizone, L.D. Eltis, and F.H. Crocker. 2010. Functional characterization of pGKT2, a 182-kilobase plasmid containing the *xplAB* genes, which are involved in the degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by *Gordonia* sp. strain KTR9. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6329-6337.
- Jakimowicz, D., K. Chater, and J. Zakrzewska-Czerwinska. 2002. The ParB protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) recognizes a cluster of *parS* sequences within the origin-proximal region of the linear chromosome. *Mol. Microbiol.* 45, 1365-1377.
- Keck, A., D. Conradt, A. Mahler, A. Stolz, R. Mattes, and J. Klein. 2006. Identification and functional analysis of the genes for naphthalenesulfonate catabolism by *Sphingomonas xenophaga* BN6. *Microbiology* 152, 1929-1940.
- Kim, D., Y.S. Kim, S.K. Kim, S.W. Kim, G.J. Zylstra, Y.M. Kim, and E. Kim. 2002. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3270-3278.
- Kim, D., S. Shin, K.Y. Choi, and E. Kim. 2008. Temperature-induced loss of linear catabolic megaplasmid (pDK2) in *Rhodococcus* sp. strain DK17, Abstr. B-031, p. 145. Abstr. 2008 *Int. Meet. Kor. Microbiol. Soc.*
- König, C., D. Eulberg, J. Gröning, S. Lakner, V. Seibert, S.R. Kaschabek, and M. Schlömann. 2004. A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiology* 150, 3075-3087.
- McLeod, M.P., R.L. Warren, W.W. Hsiao, N. Araki, M. Myhre, C. Fernandes, D. Miyazawa, W. Wong, A.L. Lillquist, D. Wang, and *et al.* 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15582-15587.
- Mongodin, E.F., N. Shapir, S.C. Daugherty, R.T. Deboy, J.B. Emerson, A. Shvartzbeyn, D. Radune, J. Vamathevan, F. Riggs, V. Grinberg, and *et al.* 2006. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet.* 2, 2094-2106.
- Pang, X., Y. Sun, J. Liu, X. Zhou, and Z. Deng. 2002. A linear plasmid temperature-sensitive for replication in *Streptomyces hygroscopicus* 10-22. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 25-28.
- Rosenberg, C., P. Boistard, J. Dénarié, and F. Casse-Delbart. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184, 326-333.
- Saeiki, H., M. Akira, K. Furuhashi, B. Averhoff, and G. Gottschalk. 1999. Degradation of trichloroethene by a linearplasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology* 145, 1721-1730.
- Shimizu, S., H. Kobayashi, E. Masai, and M. Fukuda. 2001. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2021-2028.
- Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159-271.
- Stecker, C., A. Johann, C. Herzberg, B. Averhoff, and G. Gottschalk. 2003. Complete nucleotide sequence and genetic organization of the 210-kilobase linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2. *J. Bacteriol.* 185, 5269-5274.