The Korean Journal of Microbiology, Vol. 39, No. 3, September 2003, p. 123-127
Copyright©2003, The Microbiological Society of Korea

Sphingomonas chungbukensis DJ77 균주에서 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase를 암호화하는 *phnS* 유전자의 염기서열과 상동성 분석

엄현주 · 강민희 · 김영필 · 김성재 · 김영창[1,2,*]

[1]충북대학교 자연과학대학 생명과학부, [2]충북대 바이오연구소

***Sphingomonas chungbukensis* DJ77은 phenanthrene을 단일 탄소원과 에너지원으로 이용하여 살아갈 수 있다. pUPX5는 phenanthrene과 naphthalene 분해를 위해 필요한 2-hydroxychromene-2-carboxylate (HCCA) isomerase를 암호화하는 *phnS* 유전자를 포함한다. 본 논문에서는 *phnS* 유전자가 포함된 3271 bp의 염기 서열을 결정하였다. 이 유전자는 ATG를 개시코돈으로 사용하며, TAA를 종결 코돈으로 사용하고 있다. 또한 개시 코돈의 5 bp 앞쪽으로 GGAA라는 ribosomal binding site를 갖는다. *phnS*는 총 594 bp의 open reading frame을 포함하며, 158개의 아미노산으로 구성되었다. *phnS*를 구성하는 아미노산 서열은 *S. aromaticivorans* F199의 유사 서열과 87%의 유사성을 나타냈다. *phnS* 유전자는 biphenyl dioxygenase를 구성하는 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase를 암호화하는 *phnQ*와 ferredoxin를 암호화 하는 *phnR*과 같은 operon을 이루며, 이들 유전자의 downstream에 위치하고 있다.**

Key words □ ***Sphingomonas chungbukensis* DJ77, *phnS*, 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase**

급속히 발전하는 현대 사회에서는 수많은 탄화수소물질(hydrocarbon)의 발생이 기하급수적으로 증가되고 있다. 특히, 유기 화학공업의 발달로 방향족 탄화수소와 지방족 탄화수소의 종류와 양이 증가되고 있다. 이중 방향족 탄화수소(aromatic hydrocarbon)는 지방족 탄화수소(aliphatic hydrocarbon)보다 난분해성으로 자연계에 지속적으로 축적되는 특징을 가지고 있다. 최근 이런 물질은 인체의 발암원이나 생물체의 돌연변이를 일으키는 물질로 인식되어 환경적, 보건적으로 큰 관심을 끌고 있다.

Sphingomonas chungbukensis DJ77은 phenanthrene, naphthalene, m-xylene, anthracene, salicylate, toluene 등 광범위한 방향족 탄화수소를 단일 영양원으로 사용하는 분해능을 가지고 있다. 현재까지, 방향족 탄화수소의 생분해에 관련한 유전자를 *S. chungbukensis* DJ77로 부터 cloning하였고 그 유전자들의 염기서열을 결정하였다(11, 8, 1, 10).

S. chungbukensis DJ77이 다고리 방향족 탄화수소인 biphenyl, phenanthrene, naphthalene 등을 단일 탄소영양원으로 사용하기 위해서는 먼저 biphenyl, phenanthrene, naphthalene의 고리에 OH기를 부여하는 dioxygenase류가 필요하며, *cis*-dihydrodiol dehydrogenase를 암호하는 *phnO* (11)와 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase를 암호화하는 *phnQ* (8)의 작용으로 생성된 2-hydroxychromene-2-carboxylate를 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase의 작용으로 *trans-o*-hydroxylbenzylidenepyruvate를 만들어 고리를 완전히 개환한다(Fig. 1). 이러한 작용 중 본 연구에서 2-hydroxychromene-2-carboxylate를 *trans-o*-hydroxylbenzylidenepyruvate를 생성하는 효소인 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase를 암호화하는 유전자를 동정하였기에 보고하는 바이다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2302, Fax: 82-43-268-2538
E-mail: youngkim@chungbuk.ac.kr

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 이미 보고 된 바 있는 *Sphingomonas chungbukensis* DJ77를 사용하였다. 이전 논문에서 보고 한 바와 같이 plasmid pUPX5에서 하위클론을 제작하여 pUPX5002, pUPX5003, pUPX5004등을 제조하였다. 형질전환을 위한 숙주 세포로는 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고, 클로닝을 위한 vector는 pBluescriptⅡ SK(+) (Stratagene Co, USA)를 이용하였다. 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. 완전 배지로는 LB (Luria-Bertani)배지를 사용하였다.

DNA 추출 및 조작

S. chungbukensis DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy (16) 등의 방법에 따라 추출하였으며 plasmid DNA는 Sambrook (15) 등의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한 효소 및 T4 DNA ligase (Takara, Korea)등을 구입하여 사용하였으며, 반응조건은 회사의 방법을 따랐다.

염기서열 결정과 분석

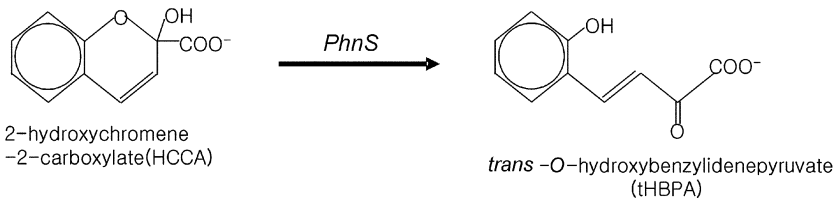

Fig. 1. The proposed degradation pathway of 2-hydroxychromene-2-carboxylate in DJ77.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains	Relevant characteristics	References
Sphingomonas chungbukensis DJ77	Phn^+ Bph^+	(9)
E. coli XL1-Blue	*supE*44 *hsdR*17 *recA*1 *endA*1*gyrA*46 *thirelA*1 *lac*⁻ *F'*[*proAB*⁺ *lacI*^{q} *lacZ*M15 *Tn*10(*tet*)]	Stratagene Co.
plasmids		
pBluescript II SK(+)	Ap^r	Stratagene Co.
pUPX5	5 kb *Xho* I fragment of DJ77 inserted into SK(+)	–
pUPX5002	0.9 kb *Hin*d III - *Sal* I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5003	0.3 kb *Eco*R I -*Hin*d III fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5004	1.2 kb *Pst* I - *Sal* I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5006	0.6 kb *Hin*d III -*Cla* I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work
pUPX5010	1.8 kb *Xho* I -*Pst* I fragment of pUPX5 in SK(+)	This work

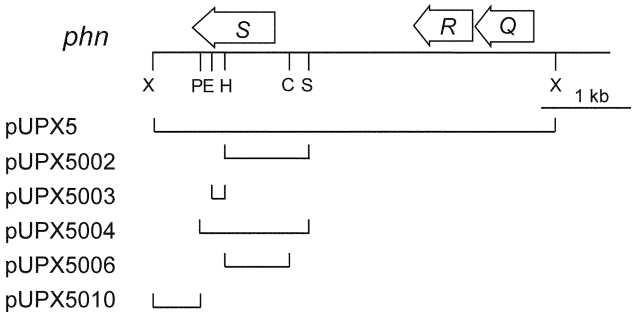

Fig. 2. Physical map of recombinant plasmid pUPX5 and pUPX5002 and its derivatives. Abbreviations : X, *Xho* I; P, *Pst* I; E, *Eco*R I; H, *Hin*d III; C, *Cla* I; S, *Sal* I.

Applied Biosystems automated DNA sequencer (Model 370, Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정에 사용한 하위클론들은 Table 1과 같고, plasmid DNA는 AtmanBio Plasmid Miniprep Kit (Takara, Korea)를 사용하여 추출하였다. 염기서열과 아미노산서열은 BLASTN, BLASTP, TBLASTN program (2)를 이용하여 분석하였고, 다중 서열 정렬과 계통학적 분석은 CLUSTALX (18)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase 유전자인 *phnS*의 위치

```
CGTCCAGAACGCCATCGTCGGCGAGGCAAGCGCGACGTCCTACATCGCGATGGGTGGCGG   60
TCGAGCCGAGGATGCCGACCATCTCGTCACCGAGGGCGCGATCATCGGGTTCTGGGACAA  120
TTATCGCAAAATGGTCGGCTTTGAGGTGGAACCGGCATGACCCGCACGATCGACTTCTAC  180
                          M  T  R  T  I  D  F  Y
TTCGATTTCATCAGCCCGTTCAGCTACCTTGCCCAGCTCAAGCTGCCGGGGATCGCGCGG  240
F  D  F  I  S  P  F  S  Y  L  A  Q  L  K  L  P  G  I  A  R
GCAGCGGGAAGCACGGTGGAATACTGGCCGATTGACATTCCTGAAGCCAAAATTGCCGCC  300
A  A  G  S  T  V  E  Y  W  P  I  D  I  P  E  A  K  I  A  A
GGCAACTATGGCCCGTCCAATCGCGAAGTCTTGCCCAAGATCAAGGTCATGAAGGCAGAC  360
G  N  Y  G  P  S  N  R  E  V  L  P  K  I  K  V  M  K  A  D
CTTGAGCGCTGGGCCGAACGTTATGGGGTGCCCCTCACCTTCCCGGCGAGCTTCGCTTGC  420
L  E  R  W  A  E  R  Y  G  V  P  L  T  F  P  A  S  F  A  C
GCAGACTGGAATTGCGCGGTGCTGTTCGCCCGCGAGCACGGTAAGGCCGAGGCATTTGTG  480
A  D  W  N  C  A  V  L  F  A  R  E  H  G  K  A  E  A  F  V
ACCGATGCCTACCGCCGGATCTGGGGCCAGGGGATCGATCCGGGCGACCGCAACGAGCTG  540
T  D  A  Y  R  R  I  W  G  Q  G  I  D  P  G  D  R  N  E  L
GCCGCATGCGCCAAAGCAGCGGGTCTCGACGCTGAGGCGCTGATTGCCTTCGTTGAATCG  600
A  A  C  A  K  A  A  G  L  D  A  E  A  L  I  A  F  V  E  S
CCGACTGGCCAGAACGAATATCGCAAGGCCCGGAGCCAGGCGATCCAGCGCGGCGTGTAC  660
P  T  G  Q  N  E  Y  R  K  A  R  S  Q  A  I  Q  R  G  V  Y
GGTGCGCCGCTGATGTTCGTTGACGACCAGTTTTTCTGGGGGAAGGACCGATTGGATTTT  720
G  A  P  L  M  F  V  D  D  Q  F  F  W  G  K  D  R  L  D  F
CTTGCCGAGTATTTGAACAAGTCAAAATAAAAATTCGATTACACAAGGGGGGATGCATGA  780
L  A  E  Y  L  N  K  S  K  *
AAAGGTATGATTGCTTTTTTGTCGCCTTGTTGGGAGTGACCGCGTNGACGCCGCAGATGG  840
CCTTAGCACAAGACTTCACAAGCGAAACGGACGAATCCCAGCCTGCCAGCACGGGCTAG   899
```

Fig. 3. Nucleotide sequence of the *phnS* gene encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (GenBank accession number AY322481). A putative ribosome binding site is underlined. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence are shown in 1-letter code, and an asterisk indicates the stop codon.

2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase를 암호화하는 유전자인 *phnS*를 결정하기 위해서 pUPX5의 제한 효소 지도를 바탕으로

여러 가지 하위클론들을 제조하였다 (Fig. 2). *S. chungbukensis* DJ77의 *phn* operon III에 포함되어 있는 2-hydroxychromene-2-carboxylate (HCCA) isomerase를 암호하는 *phnS*는 phenanthrene, napthalene 등 다고리 방향족 탄화수소의 분해에 관련이 있으며, ferredoxin을 암호하는 *phnR* (1)과 2-3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase를 암호하는 *phnQ*와 같은 operon안에 하류방향으로 위치하고 있었다.

phnS 유전자의 구조

전에 보고 된 pUPX5를 이용하여 제작된 하위클론을 이용하여 *phnS* 유전자가 위치하고 있는 서열을 결정하였다. 유전자 *phnS*는 개시코돈으로 ATG를 사용하고 종결코돈 TAA를 가진 591 bp로 이루어진 open reading frame (ORF)이다. 리보좀 결합부위로 생각되는 염기서열 (5'-GGAA-3')는 이 ORF의 개시코돈으로부터 4 bp

Table 2. Homology of the deduced amino acid sequence of *phnS* and the sequences of other 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases

Precent divergence	Percent similarity											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1		94	77	45	41	54	39	39	39	39	39	PhnS-DJ77
2	94		79	76	42	37	41	42	40	40	41	NahD-F199
3	77	79		76	44	36	41	42	42	42	40	NahD-P2
4	76	77	75		42	37	42	42	42	42	42	PhnD-BN6
5	41	42	44	42		41	50	49	48	48	45	PhnD-AFK2
6	36	36	36	40		44	44	44	44	44	43	DbtD-DBT11
7	35	37	37	39	43	40		82	78	77	68	NahD-PpG7
8	39	42	42	42	49	45	94		88	87	76	PahD-OUS82
9	39	40	42	42	48	45	90	82		99	80	PahE-PaK1
10	39	40	42	42	48	45	90	87	99		81	DoxJ-C18
11	39	41	40	42	45	44	79	76	80	81		NAhD-AN10

1, From *Sphingomonas chungbukensis* DJ77; 2, *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (14); 3, *Sphingomonas* sp. P2 (13); 4, *Sphingomonas* sp. BN6 (17); 5, *Alcaligenes faecalis* AFK2 (unpublished [GenBank accession number AB024945]); 6, *Burkholderia* sp. DBT1 (unpublished [GenBank accession number AF404408]); 7, *Pseudomonas putida* PpG7 (6); 8, *Pseudomonas putida* OUS82 (12); 9, *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 (unpublished [GenBank accession number D84146]); 10, *Pseudomonas* sp. C18 (5); 11, *Pseudomonas stutzeri* AN10 (4).

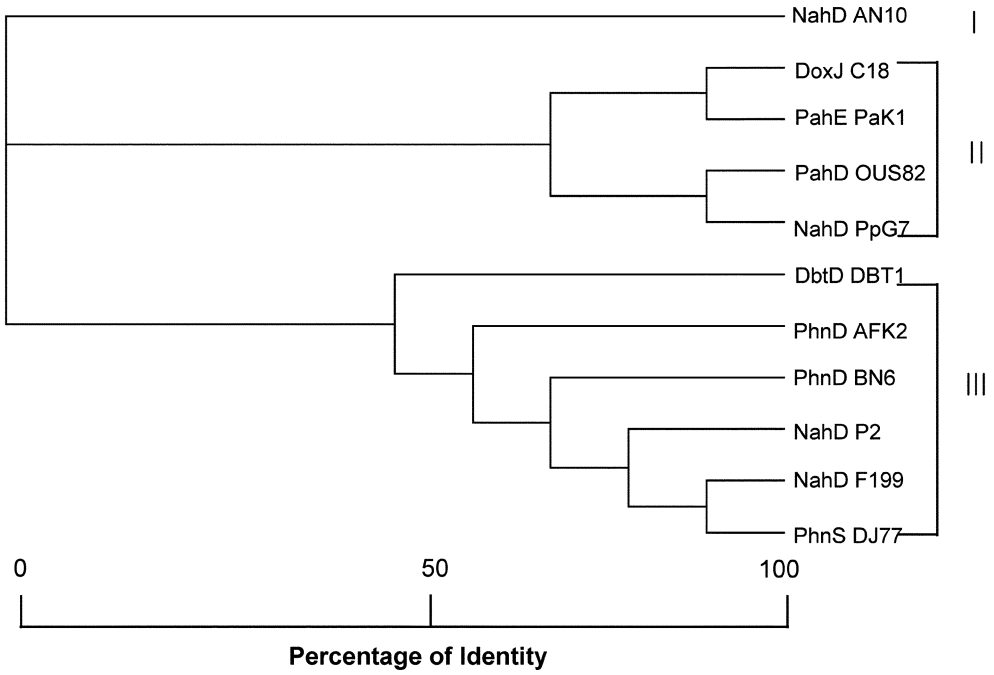

Fig. 4. Dendrogram showing the levels of homology between the amino acid sequences of different 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase. The dendrogram was constructed with the CLUSTALX program.

앞에 존재한다 (Fig. 3). 이 ORF의 G+C 함량은 60.3%로 지금까지 *S. chungbukensis* DJ77에서 밝혀진 catechol 2,3-dioxygenase 유전자 *phnE* (58%), 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase 유전자 *phnD* (61%), 그리고 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase 유전자 *phnQ* (61%)와 비슷하였다 (10). 이 ORF에서 유추한 아미노산은 197개이며 이들이 암호화하고 있는 단백질의 분자량은 27.7 kDa이었다.

*phnS*의 상동성 비교와 기능

*phnS*의 염기서열에서 추정된 아미노산 서열을 BLASTP를 통하여 분석한 결과 다른 여러 균주에서 밝혀진 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase와 상동성이 있는 것으로 분석되었다. 이중에서 가장 높은 상동성이 있는 것은 *Novosphingobium aromaticivorans* F199 plasmid pLN1의 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase (14, [GenBank accession number NP049214])로써 아미노산 서열을 비교하였을 때 87%로 가장 높았다. 그리고 *Pseudomonas putida* RE204의 *nahB* (7)와 *Burkholderia* sp. PS12 *tecB* (3)는 44%의 상동성을 나타내었다. 그 밖에 여러 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase의 아미노산 서열과의 비교 결과는 Table 2와 같다. 2-hydroxychromene-2-carboxylate iso-merase 효소들의 단백질 서열을 CLUSTALX를 통하여 다중 서열 정렬을 한 결과 아미노산 번호 6에서 18까지의 영역이 잘 보존되어 있었다. 아미노산 서열의 상동성을 50%를 기준으로 하여 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase를 3개 종류로 나누면 *phnS*는 세 번째 그룹에 속하면서 그 중에서 *Sphingomoans* sp. F199와 같이 분류됨을 알 수 있었다 (Fig. 4).

아미노산 서열의 상동성 분석에 의하면 DJ77의 phenanthrene 분해에 관여하는 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase는 biphenyl, toluene 그리고 naphthalene의 분해에 관여하는 효소와 공통조상으로부터 유도되었음을 알 수 있다. 앞으로 이들의 기능에 대한 비교 연구가 필요하다.

감사의 말

이 연구는 한국학술진흥재단 (2000-015-DS0031) 지원의 연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 김성재, 박용춘, 김치경, 임재윤, 이기성, 민경희, 김영창. 1997. *Pseudomonas* sp. strain DJ77에서 riske-type의 ferredoxin을 암호화하는 *phnR* 유전자의 구조. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 367-373.
2. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25, 3389-3402.
3. Beil, S., B. Happe, K.N. Timmis, and D.H. Pieper. 1997. Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12-dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Eur. J. Biochem*. 247, 190-199.
4. Bosch, R., E. Garcia-Valdes, and E.R. Moore. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 236, 149-157.
5. 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.
6. Eaton, R.W. 1994. Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and *trans-o*-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *J. Bacteriol.* 176, 7757-7762.
7. Eaton, R.W., and K.N. Timmis. 1986. Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204. *J. Bacteriol.* 168, 123-131.
8. Kim, S.J., H.J. Shin, Y.S. Kim, K.H. Min, and Y.C. Kim. 1999. The 2,3-dihydroxylbiphenyl 1,2-dioxygenase gene (*phnQ*) of *Pseudomonas* sp. DJ77: nucleotide sequence, enzyme assay, and comparison with isofunctional dioxygenases. *J. Biochem. Mol. biol.* 32, 399-404.
9. Kim, S.J., 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. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1641-1647.
10. 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.
11. Kim, Y.P., S.J. Kim, H.J. Um, and Y.C. Kim. 2002. *Sphingomonas* sp. DJ77 *cis*-dihydrodiol dehydrogenase *phnO* 유전자의 염기서열과 상동성 분석. *Bulletin of the Natural Sicences* 16, 37-48.
12. Noboru, T., N. kaida, S. Torigoe, T. Moritani, T. Sawada, S. Satoh, and H. Kiyohara. 1994. Identification and characterization of gene encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol*. 179, 2444-2449.
13. Pinyakong, O., H. Habe, T. Yoshida, H. Nojiri, and T. Omori. 2003. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 350-357.
14. 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.
15. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
16. Silhavy, T.J., M.L. Berman, and L.W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
17. Thomassin-Lacroix, E.J., Z. Yu, M. Eriksson, K.J. Reimer, and W.W. Mohn. 2001. DNA-based and culture-based characterization of a hydrocarbon-degrading consortium enriched from Arctic soil. *Can. J. Microbiol.* 47, 1107-1115.
18. Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 24, 4876-4882.

(Received June 24, 2003/Accepted August 14, 2003)

ABSTRACT : Sequence and phylogenetic analysis of the *phnS* gene encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in *Sphingomonas chungbukensis* DJ77

Hyun-Ju Um, Min-Hee Kang, Young-Pil Kim, Seong-Jae Kim, and Young-Chang Kim[1,2,*]
([1]School of Life Sciences, Chungbuk National University, [2]Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763)

Sphingomonas chungbukensis DJ77 is able to metabolize phenanthrene as the sole carbon and energy source. The plasmid pUPX5 includes *phnS* gene encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate (HCCA) isomerase, which is needed for phenanthrene and naphthanene degradation. We determined the nucleotide sequence of DNA fragment of 3271 bp which included the *phnS* gene. The fragment included an open reading frame of 594 bp which has ATG initiation codon and TAA termination codon and GGAA ribosomal binding site. The predicted amino acid sequence of the enzyme consists of 198 amino acids. The deduced amino acid sequence of the *phnS* enzyme exhibited 94% identity with that of the corresponding enzyme in *Sphingomonas aromaticivorans* F199. The *phnS* gene is located downstream and in the same operon as *phnQ* and *phnR*, encoding a 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase and a ferredoxin component of biphenyl dioxygenase, respectively.