KOR. JOUR. MICROBIOL. July, 1991 p. 155-159 Vol. 29, No. 3

*Pseudomonas putida*의 Catechol 2, 3-dioxygenase 유전자의 클로닝

김영수 · 최봉수 · 민경락 · 김치경*
충북대학교 약학과, *미생물학과

Cloning of Catechol 2, 3-dioxygenase Gene from *Pseudomonas putida*

Kim, Youngsoo, Bongsoo Choi, Kyung Rak Min and Chi-Kyung Kim*
*Department of Pharmacy, *Department of Microbiology*
Chungbuk National University, Cheongju 360-763 Korea

ABSTRACT: Four strains of *Pseudomonas putida* (NAH), *Pseudomonas* sp. (TOL), *Achromobacter xylosoxidans*, and *Alcaligenes* sp. were compared with their degradative capability of aromatic compounds. All of the bacterial strains were utilized catechol as a sole carbon source for growth, but significantly different in degradative properties for 5 other aromatic compounds. Catechol 2, 3-dioxygenase gene from *P. putida* (NAH) has been cloned and expressed in *E. coli*. The DNA clone designated pCNU101 contains NAH-derived 6 Kb insert and its physical map was characterized. A subclone (pCNU106) for the catechol dioxygenase gene in pCNU101 contained 2.0 kb-DNA insert fragmented by HpaI and ClaI.

KEY WORDS □ ***P. putida*, catechol 2,3-dioxygenese, NAH plasmid, Tol plasmid**

방향족 오염물질은 인간을 포함한 각종의 생물체에 강한 독성을 나타내는 유기화합물로서 산업의 발달에 따라 환경에 유출되는 양 및 종류가 증가하고 있다. 일반적으로 방향족화합물은 화학구조적 측면에서 안정하여 난분해성 특징을 나타내며 토양 및 하천에 유입되면 축적된다. 그러나 자연환경에서 미생물에 의해 생산되는 효소들에 의해 분해될 수 있다.

미생물에 의한 각종의 방향족화합물들, 즉 naphthalene, biphenyl류, phenanthrene, toluene, hydroxy 또는 methylbenzoate류의 분해에 관여하는 효소들의 유전자는 분해플라스미드 또는 chromosomal DNA에 operon 형태로 존재한다(Chakraberty, 1976; Kim과 Tu, 1989; Pemberton, 1985). 각종의 방향족화합물들은 미생물에 의한 분해과정에서 공동중간체(common intermediate)인 catechol을 형성하며, catechol의 benzene ring이 개열되어 지방족화합물로 변형된 후 일련의 효소반응에 의해 TCA cycle의 중간체로 완전 분해된다(Ornston, 1971; Franklin 등, 1983; Don과 Pemberton, 1981; Furukawa와 Matsumura, 1976). 방향족 분해중간체인 catechol의 benzene ring 개열은 catechol dioxygenase의 촉매에 의해 일어나며, catechol 1, 2-dioxygenase 및 catechol 2, 3-dioxygenase로 분류되며, 이들은 산소분자의 두 산소원자를 반응산물에 모두 투입시키는 전형적인 dioxygenase 들이다. Catechol dioxygenase는 각종의 방향족화합물의 분해에 관여하고, 또한 난분해성 방향족을 물리화학적 반응이 용이하게 일어날 수 있는 지방족화합물로 변화시키는 화학반응에 직접적으로 관여하므로 방향족 오염물질의 정화 측면에서 중요한 효소이다. 그러나 catechol dioxygenase의 catechol 유도체에 대한 기질특이성 범위, 분해능 등의 효소활성에 대한 연구는 미흡한 상황이다. *Pseudomonas putida*(NAH)와 *Pseudomonas* sp.(TOL)내에 존재하는 각 catechol 2, 3-dioxygenase는 catechol을 2-hydroxymuconic semialdehye로 변형시키는 화학반응을 촉매한다(Fig. 1). 그러나 catechol 유도체에 대한 기질특이성의 범위 및 효소활성 측면에서는 차이가 있다(Harayama와 Rekik, 1989; Nakai 등, 1983; Rojo 등, 1987). 그러므로 방향족 오염물질의 종류에 따라 catechol 2, 3-dioxygenase는 진화적 적응이 상이하게 일어난 것으로 사료된다.

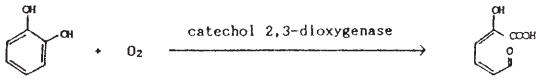

Fig. 1. *Diagramatic representation of chemical reaction catalyzed by catechol 2, 3-dioxygenase.*
Catechol is converted to 2-hydroxymuconic semialdehyde by *meta* cleavage of a benzene ring.

본 연구에서는 방향족화합물의 분해능이 있는 미생물균주들을 확보하여 그들의 방향족 분해능력을 평가했다. 그리고 catechol dioxygenase의 구조 및 분해능 측면에서 방향족 오염물질의 종류에 따른 진화적 적응을 규명하는 기초과학연구의 일환으로 *P. putida*(NAH)에서 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자를 클로닝 방법으로 확보했으며, 이 효소의 유전자를 함유하는 DNA 클론의 제한효소지도를 작성했다. 그리고 deletion 방법으로 catechol dioxygenase 유전자를 적당한 subcloning 및 *Escherichia coli* 내에서 이 효소의 발현을 유도했다.

재료 및 방법

미생물균주와 배지

P. putida(NAH), *Pseudomonas* sp.(TOL), *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes* sp.들은 M9 salt 배지에 단일탄소원으로 0.1% 방향족화합물을 첨가한 최소배지에서 배양하였다. 즉 *P. putida*(NAH)의 경우 0.1% 2-hydroxybenzoate를 단일탄소원으로 첨가한 M9 최소배지를 사용하였으며, 필요에 따라 LB배지에서 배양했다(Kim, 1988). Catechol dioxygenase 유전자의 클로닝을 위하여 host로 사용한 *E. coli* HB101은 LB배지에서 배양하였으며, 필요에 따라 ampicillin(50 μg/m*l*) 또는 tetracycline(15 μg/m*l*)를 첨가한 LB배지도 사용했다.

플라스미드 분리 및 전기영동

P. putida(NAH) 내에 있는 분해플라스미드인 NAH는 alkali-SDS lysis 및 PEG600 precipitation 방법을 응용하여 분리했다(Hansen과 Olsen, 1978). *E. coli* HB101 내의 recombinant 플라스미드 또는 클로닝 vector로 사용한 pBR322를 분리하기 위해 alkali lysis 방법을 도입하였으며, 필요에 따라 ethidium bromide-CsCl sedimentation을 병용하였다(Marko 등, 1982). 플라스미드들은 TAE buffer를 사용한 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 동정했다.

NAH library 제조

분해플라스미드 NAH와 클로닝 vector인 pBR322를 각각 제한효소를 처리하여 절단했다. 제한효소의 처리는 각 효소의 공급회사에서 추천하는 조건에서 실시했다. 제한효소로 절단된 NAH 및 pBR322를 혼합한 후 T_4 DNA ligase을 이용하여 recombinant pool을 제조하고 $CaCl_2$로 처리된 host인 competent *E. coli* HB101에 transformation하여 NAH library를 제조했다. Ligation 및 transformation의 반응조건은 이미 보고된 방법을 사용했다(Maniatis 등, 1982).

Table 1. *Biodegradation of aromatic compounds by bacterial strains*

Strain	Aromatic compound					
	Bip	Cat	Hben	Mben	Nap	Tol
Pseudomonas putida (NAH)	−	+	+	−	+	−
Pseudomonas sp. (TOL)	−	+	−	+	−	+
Achromobacter xylosoxidans	+	+	+	−	−	−
Alcaligenes sp.	+	+	−	+	−	−

Aromatic compounds are biphenyl (Bip), catechol (Cat), hydroxybenzoate (Hben), methylbenzoate (Mben), naphthalene (Nap), and toluene (Tol). Each strain can (+) or can not (−) utilize the indicated compound as a sole carbon source.

Catechol 2, 3-dioxygenase의 활성측정

E. coli HB101 또는 클론을 함유한 *E. coli* HB101을 LB배지에서 log phase까지 배양한 bacterial pellet을 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 sonication 방법으로 파괴한 후, 28,000×g에서 20분간 원심분리하여 crude lysate을 제조했다. 이 crude lysate의 catechol 2, 3-dioxygenase 활성은 0.5 M catechol, 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)의 반응조건에서 반응산물인 2-hydroxymuconic semialdehyde에 의한 파장 375 nm에서 흡광도의 증가를 측정했다. Catechol 2, 3-dioxygenase의 unit은 1분 동안 생성되는 2-hydroxymuconic semialdehyde의 nmol 수로 산출했다(Zukowski 등, 1983). 이 효소의 unit와 파장 375 nm에서의 흡광도 변화와의 상관성은 다음과 같다.

$$\text{Unit(s)} = (\Delta A_{375}/\text{min})/0.03$$

ΔA_{375}은 파장 375 nm에서 흡광도 변화이고, 0.03은 같은 파장에서 2-hydroxymuconic semialdehyde의 nanomolar extinction coefficient이다. Catechol 2, 3-dioxygenase의 specific activity는 단백질 mg당 units로 표시했다. 단백질의 양은 Lowry 방법으로 측정했다(Lowry 등, 1951).

결과 및 고찰

방향족화합물의 분해능

단일탄소원으로 biphenyl, naphthalene, toluene, hydroxybenzoate, methylbenzoate, 또는 catechol을 사용하여 *P. putida*(NAH), *Pseudomonas* sp.(TOL), *A. xylosoxidans* 및 *Alcaligene* sp. 등 미생물균주들의 생사를 검정함으로서 방향족화합물에 대한 분해능력

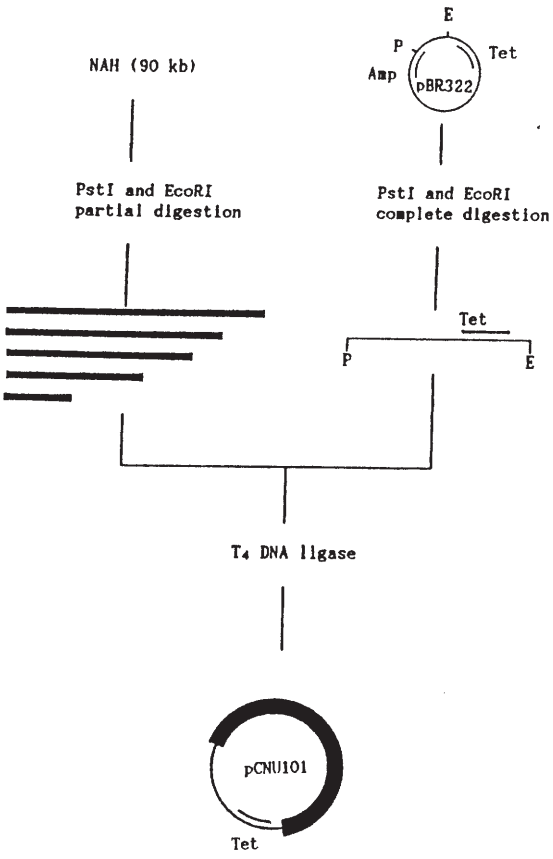

Fig. 2. *Schematic representation of the construction of recombinant plasmid, pCNU101.*
pCNU101 is a hybrid plasmid of NAH (bold line) and pBR322 (thin line) fragments digested with EcoRI (E) and PstI (P). Genetic marker resistant to ampicillin (Amp) or tetracycline (Tet) is indicated in the pBR322 and pCNU101.

을 평가했다. 상기한 4개의 미생물균주들은 모두 catechol을 분해할 수 있는 능력이 있었으나, 다른 방향족화합물들에 대한 분해능력은 현저한 차이를 나타냈다(Table 1). 즉 *P. putida*(NAH)는 naphthalene과 hydroxybenzoate를, *Pseudomonas* sp.(TOL)는 toluene과 methylbenzoate를 *A. xylosoxidans*는 biphenyl과 hydroxybenzoate를, 그리고 *Alcaligenes* sp.는 biphenyl과 methylbenzoate를 단일탄소원으로 이용할 수 있는 분해능력을 나타냈다.

NAH-catechol dioxygenase 유전자의 클로닝

Pseudomonas 속에서 검색된 분해플라스미드인 NAH는 naphthalene을 pyruvate 와 acetaldehyde로 분해시킬 수 있는 13개의 효소 유전자를 함유하고 있으며, 크기가 90 kb 정도되는 플라스미드이다 (Schell, 1983). 분해플라스미드인 NAH 내에 존재

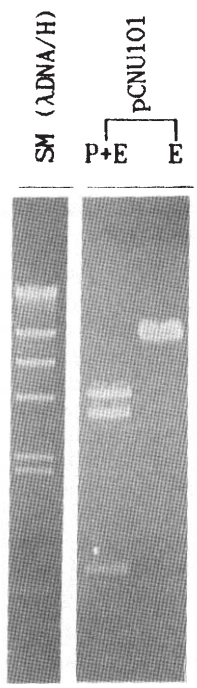

Fig. 3. *Gel pattern of pCNU101 digested by restriction enzyme(s).*
Size marker (SM) is HindIII-digested lambda with 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 and 0.6 Kb in size (left lane). Recombinant plasmid, pCNU 101 was digested with PstI plus EcoRI (middle lane) or EcoRI (right lane).

하는 catechol 2, 3-dioxygenase는 catechol의 benzene ring을 *meta* cleavage 경로에 의해 개열하여 2-hydroxymuconic semialdehyde를 생성하는 화학반응을 촉매한다(Yen과 Gunsalus, 1982). 이 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자를 확보하기 위해 Fig. 2에서와 같은 방법으로 클로닝을 수행하였다. *P. putida*(NAH)에서 분해플라스미드인 NAH를 분리한 후 PstI 및 EcoRI으로 처리하여 제한효소 절편을 만들고, 클로닝 vector인 pBR322를 PstI 및 EcoRI으로 절단한 후, 3.6 kb의 제한효소절편을 사용했다. 제한효소로 절단된 NAH와 pBR322-3.6 kb의 절편을 ligation하고, host인 *E. coli* HB101에 transformation하여 NAH library를 제조했다. NAH library 내에서 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자를 함유한 클론은 antibiotic screening 및 color screening을 병용하여 선별했다. 우선 NAH library를 tetracycline을 함유한 LB 고체배지에 plating하고 각 클론들의 ampicillin에 대한 생사여부를 검정하여 tetracycline에 저항성이고 ampicillin에 감수성을 나타내는 클론들, 즉 recombinant DNA를 함유하는 클론들에 대해 color screening을 수행했다. Color screening은 recombinant DNA내 catechol 2, 3-

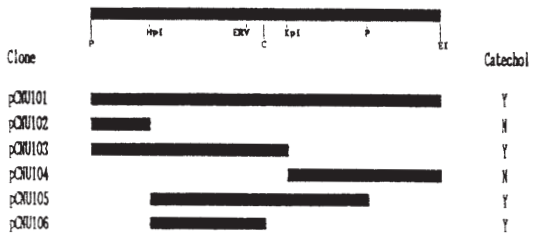

Fig. 4. Physical map and subclones of the recombinant plasmid, pCNU101.
Restriction enzymes are PstI (P), HpaI (HPI), EcoRV (ERV), ClaI (C), KpnI (KpI), and EcoRI (EI). Subclones of pCNU101 were constructed by deletion. Expression of catechol 2,3-dioxygenase in the subclones was identified by color development, yellow (Y) or colorless (N) after catechol spray.

Table 2. *Expression of NAH-catechol 2,3-dioxygenase gene in E. coli HB101.*

Plasmid	Specific activity (units/mg of protein)
None	0
pCNU101	137
pCNU102	0
pCNU103	124
pCNU104	0
pCNU105	140
pCNU106	152

Catechol 2, 3-dioxygenase activities were measured spectrophotometrically at 375 nm. One unit of the enzyme activity was defined as 1 nmol 2-hydroxymuconic semialdehyde formation per minute.

dioxygenase 유전자의 발현 및 이 효소에 의해 촉매되는 화학반응의 특성을 이용한 것이다(ZuKowski 등, 1983). Catechol 2, 3-dioxygenase가 촉매하는 화학반응에서 기질인 catechol은 무색인 반면, 반응산물인 2-hydroxymuconic semialdehyde는 노랑색을 나타낸다. 그러므로 catechol을 분무했을 때 recombinant DNA에서 발현된 catechol 2, 3-dioxygenase를 함유하는 클론은 노랑색을 나타낸다. 상기한 antibiotic 및 color screening 방법에 의해 NAH library에서 recombinant DNA를 함유하고 있는 600여개의 클론들 중 한개의 노랑색을 나타내는 클론을 선별했다. 이 클론을 pCNU101로 명명하였으며, 6 Kb의 NAH에서 유도된 insert DNA와 3.6 kb의 pBR322에서 유도된 제한효소절편이 재조합된 플라스미드로 확인됐다(Fig. 3).

pCNU101의 제한효소 지도 및 subclone의 발현

재조합 클론인 pCNU101의 제한효소지도는 각종의 제한효소로 single 또는 double digestion을 한 후 agarose gel에서 전기영동을 하여 작성했다. NAH-6 Kb의 insert DNA의 양끝을 절단하는 제한효소가 PstI와 EcoRI임이 확인되었다. 그리고 insert DNA를 절단하는 ClaI, EcoRI, EcoRV, HpaI, KpnI, PstI의 제한효소자리를 동정하였으며 AvaI, BamHI, PvuII, SalI 등의 제한효소들은 insert DNA를 절단할 수 없는 것을 확인했다(Fig. 4). 재조합 플라스미드인 pCNU101에서 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자의 위치를 동정하기 위해 deletion 방법으로 subclone를 만든 후 catechol을 분무했을 때 노랑색을 나타내는지 여부를 확인했다. PstI과 KpnI으로 절단된 3.5 Kb insert을 함유한 subclone인 pCNU103, HpaI과 PstI으로 절단된 3.8 Kb insert을 함유한 subclone인 pCNU105, 그리고 HpaI과 ClaI으로 절단된 2.0 kb insert을 함유한 subclone인 pCNU106은 catechol을 분무했을때 노랑색을 나타냈다. 그러나 PstI과 HpaI으로 절단된 1 Kb insert을 함유한 pCNU102 및 KpnI과 EcoRI으로 절단된 3 Kb insert을 함유한 pCNU104는 catechol을 분무했을 때 노랑색을 나타내지 않았다. pCNU101과 각 subclone들의 catechol 2, 3-dioxygenase 활성은 서로 비슷한 정도로 나타났다(Table 2).

적 요

방향족화합물의 분해능이 있는 *Pseudomonas putida*(NAH), *Pseudomonas* sp.(TOL), *Achromobacter xylosoxidans* 및 *Alcaligenes* sp. 등 4종류의 미생물균주에 의한 방향족화합물(biphenyl, catechol, hydroxybenzoate, methylbenzoate, naphthalene, 및 toluene)의 분해능력을 평가했다. 모든 미생물 균주들이 catechol을 완전 분해하였으나, 다른 방향족 화합물에 대한 분해능은 서로 현저히 다른 것을 확인했다. 그리고 *P. putida*(NAH)의 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자를 클로닝하고, *E. coli*에서의 발현을 유도했다. Catechol 2, 3-dioxygenase 유전자를 함유하고 있는 클론(pCNU101로 명명)은 6 Kb insert과 3.6 Kb pBR322가 재조합된 플라스미드였으며, pCUN101 내에서 catechol 2, 3-dioxygenase 유전자를 함유한 최소크기의 subclone인 pCNU106은 HpaI과 ClaI으로 절단한 2.0 kb-DNA sequence를 함유하고 있다.

사 사

본 연구는 1990년 문교부 학술연구조성비(유전공학)의 지원에 의해 수행되었으며, *Pseudomonas putida*(NAH)를 제공해준 미국 University of Georgia의 M.A. Schell에게 감사한다.

참고문헌

1. **Chakraberty, A.M.,** 1976. Plasmids in *Pseudomonas. Ann. Rev. Genet.,* **10**, 7-30.
2. **Don, R.H. and J.M. Pemberton,** 1981. Properties of six pesticides degradation plasmids isolated from *Alcaligene paradoxus* and *Alcaligene eutroplus. J. Bacteriol.,* **145**, 681-686.
3. **Franklin, F.C.H., P.R. Lehrbach, R. Lurz, B. Ruechert, M. Bagdasarian and K.N. Timmis,** 1983. Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway. *J. Bacteriol.,* **154**, 676-685.
4. **Furukawa, K. and F. Matsumura,** 1976. Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. *J. Agric. Food Chem.,* **24**, 251-256.
5. **Hansen, J.B. and R.H. Olsen,** 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.,* **135**, 227-238.
6. **Harayama, S. and M. Rekik,** 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.,* **264**, 15328-15337.
7. **Kim, Y.,** 1988. Cloning, characterization, and expression of genes encoding *Pseudomonas putida* salicylate hydroxylase and *Pseudomonas cepacia* salicylate hydroxylase and *m*-hydroxybenzoate 6-hydroxylase, Ph. D. Dissertation, University of Houston USA.
8. **Kim, Y. and S.C. Tu,** 1989. Molecular cloning of salicylate hydroxylase genes from *Pseudomonas cepacia* and *P. putida. Arch. Biochem. Biophys.,* **269**, 295-304.
9. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. Randall,** 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* **193**, 265-273.
10. **Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook,** 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. USA.
11. **Marko, M.A., R. Chipperfield and H.C. Birnboim.** 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.,* **121**, 382-387.
12. **Nakai, C., H. Kagamiyama and M. Nozaki,** 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.,* **258**, 2923-2928.
13. **Ornston, L.N.,** 1971. Regulation of catabolic pathways in *Pseudomonas. Bacterial. Rev.,* **35**, 87-116.
14. **Pemberton, J.M.,** 1985. Degradative plasmids. *Int. Rev. Cytol.* **84**, 155-183.
15. **Rojo, F., D.H. Pieper, K.-H. Engesser, H.-J. Knackmuss and K.N. Timmis,** 1987. Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degration of chloro- and methylaromatics. *Science,* **238**, 1395-1398.
16. **Schell, M.A.,** 1983. Cloning and expression in *E. coli* of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7. *J. Bacteriol.*, **153**, 822-829.
17. **Yen, K.-M. and I.C. Gunsalus,** 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **79**, 874-878.
18. **Zukowski, M.A., O.F. Gaffney, D. Speck, M. Kauffmann, A. Findeli, A. Wisecup and J.-P. Lecocq,** 1983. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **80**, 1101-1105.

(Received April 14, 1991)
(Accepted July 15, 1991)