

Article

Pseudomonas alkylphenolica KL28에 존재하는 3종류의 *p*-cresol 분해 경로 및 유전자 발현

성진일 · 이 경*

창원대학교 생명보건의학부

Identification of three pathways for *p*-cresol catabolism and their gene expression in *Pseudomonas alkylphenolica* KL28

Jin Il Sung and Kyoung Lee*

Department of Bio Health Science, Changwon National University, Gyeongnam 51140, Republic of Korea

(Received August 24, 2016; Revised September 9, 2016; Accepted September 9, 2016)

ABSTRACT: Previously our laboratory showed that *Pseudomonas alkylphenolica* KL28 possesses two different *lap* and *pcu* gene clusters for *p*-cresol catabolism. In this study, additional gene cluster [*pchACXF-pcaHG-orf4-pcaBC*] has been identified to encode enzymes necessary for catabolism of *p*-cresol to β -carboxy-*cis,cis*-muconate. This gene cluster showed almost identical nucleotide sequence homologies to those in the plasmid of *Pseudomonas putida* NCIMB 9866 and 9869, British origins, indicating the possibility of a horizontal gene transfer. Through mutagenesis of each gene cluster and *gfp*-based promoter reporter assays, it has been shown that the three gene clusters are functionally operated and *pch* genes are induced by *p*-cresol. Furthermore, the *pcu* gene cluster of the three was shown to be dominantly expressed in utilization of *p*-cresol. Mutation of the *pcu* gene was defective in aerial structure formation under *p*-cresol vapor, indicating the utilization rate of carbon source is one of key elements for the multicellular development of this strain.

Key words: *Pseudomonas alkylphenolica*, catabolism, *p*-cresol, isoenzyme

p-Cresol은 4-메틸 페놀로 수지의 합성, 소독제 및 공업용 용매로 사용되어 왔다. *p*-Cresol은 전세계적으로 광범위하게 사용되는 향산화제 butylated hydroxytoluene의 전구 물질이며, 향수 생산 및 염색 산업에서 넓게 사용되고 있다(Joesaar *et al.*, 2010). 또한 원유, 석탄 타르 및 자동차 대기가스 및 담배 연기에도 포함되어 있다. 자연계에서는 미생물의 활동에 의해 생산된다. 예를들면 이 화합물은 인간 장내 미생물의 방향족 아미노산 발효를 통해 생산되어 대변이나 오줌으로 배출되며, 땀의 성분으로 암컷 모기의 유인 물질로 작용한다. 또한 돼지 사육장의 불쾌한 'pig odor'의 주요 물질로 알려져 있다(Yan *et al.*, 2016). 요독증(uremia) 환자는 *p*-cresol에 대해 높은 독성을 가지며, *p*-cresol에 장기간 또는 과량으로 노출되면 인체에 유해한 것으로 알려져 있다(Chang *et al.*, 2014).

세균에 의한 *p*-cresol의 호기적 분해에는 2가지 경로가 잘 알려져 있다(Bayly *et al.*, 1966). 첫째는 활성자리에 flavin을 포함하는 단일 성분의 산화효소 또는 활성자리에 di-iron을 포함하는 다성분 산화효소에 의해 *p*-cresol의 벤젠고리의 산화로 4-methylcatechol로 전환되어 *meta* 분해를 통해 TCA 회로로 유입되는 경로이다(Fig. 1). 전자는 *Pseudomonas pickettii* PKO1의 *thuD* 유전자에 암호화된 효소(Kukor and Olsen, 1992), 후자는 *Pseudomonas putida* CF600 균주의 *dmpKLMNOP* 유전자에 암호화되어 있는 다성분 산화효소가 대표적인 예이다(Shingler *et al.*, 1992). 두 번째 분해 경로는 *p*-cresol의 메틸기가 산화되는 경로로 이 경우 *p*-cresol은 *p*-cresol methylhydroxylase와 *p*-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소에 의해 *p*-hydroxybenzoate로 전환되고, 이렇게 형성된 *p*-hydroxybenzoate는 flavin을 포함하는 *p*-hydroxybenzoate 산화효소에 의해 protocatechuate로 전환되고, protocatechuate는 *pcaHG*에 암호화되어 있는 protocatechuate 3,4-dioxygenase에 의해 *ortho* 분

*For correspondence. E-mail: kyounglee@changwon.ac.kr;
Tel.: +82-55-213-3486; Fax: +82-55-213-3480

해 경로를 따라 TCA 회로로 유입된다(Dagley and Patel, 1957) (Fig. 1). *p*-Cresol methylhydroxylase와 *p*-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소를 암호화하는 유전자는 *Pseudomonas*에서 잘 보존되어 있으며 하나의 오페론으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이 오페론은 *Pseudomonas putida* NCIMB 9866와 NCIMB 9869에는 *pchACXF* (Kim *et al.*, 1994)와 *Pseudomonas mendocina* KR1 (Wright and Olsen, 1994), *Pseudomonas fluorescens* PC18과 PC24 경우는 *pcuCAXB* (Joesaar *et al.*, 2010)로 명명되어 있다. *pchA/pcuC*는 *p*-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소를 암호화하고 *pchCF/pcuAB*는 *p*-cresol methylhydroxylase를

암호화하는 것으로 알려져 있다(Fig. 2). 후자의 경우 $\alpha_2\beta_2$ 의 4차 구조를 갖고 있으며 큰 subunit은 FAD을, 작은 subunit은 cytochrome c를 함유하는 주변 세포질(periplasmic) 단백질로 알려져 있다(Cunane *et al.*, 2000). *pchX/pcuX*를 암호화하는 단백질의 기능에 대해서는 알려지지 않았다. *P. mendocina* KR1, *P. fluorescens* PC18과 PC24 균주의 프로모터는 sigma-54와 이들 유전자군과는 반대 방향으로 전사되는 XylR-형의 전사 조절자(*pcuR*)에 의해 발현의 조절을 받는 것으로 알려져 있다(Joesaar *et al.*, 2010).

P. alkylphenolica^T KL28은 창원의 공장 주변 하천 토양에

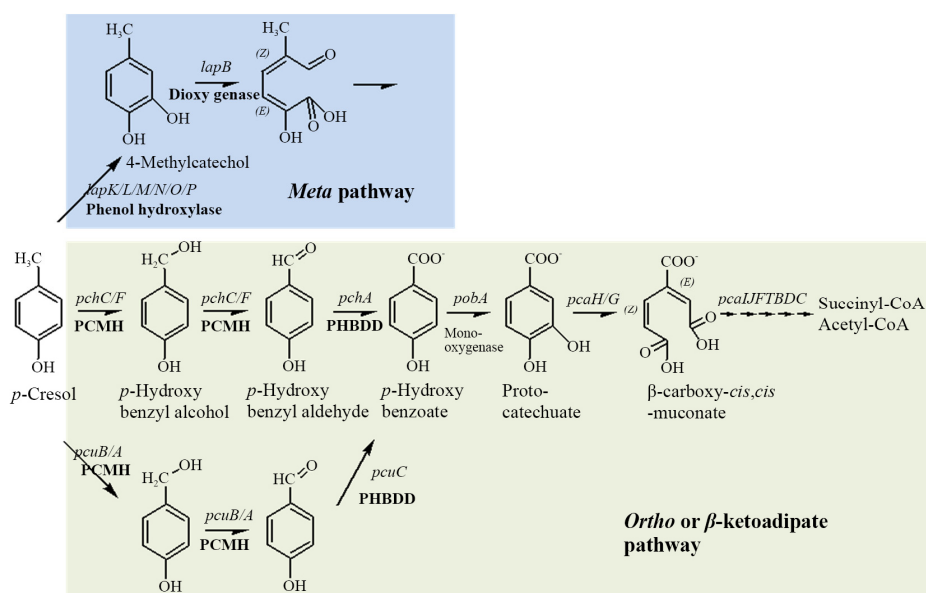


Fig. 1. Catabolism of *p*-cresol by *P. alkylphenolica* KL28. In this strain, three independent initial degradation enzymes encoded by *lap*, *pch*, and *pcu* gene clusters are involved in the catabolism of *p*-cresol. PCMh, *p*-cresol methylhydroxylase; PHBDD, *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase.

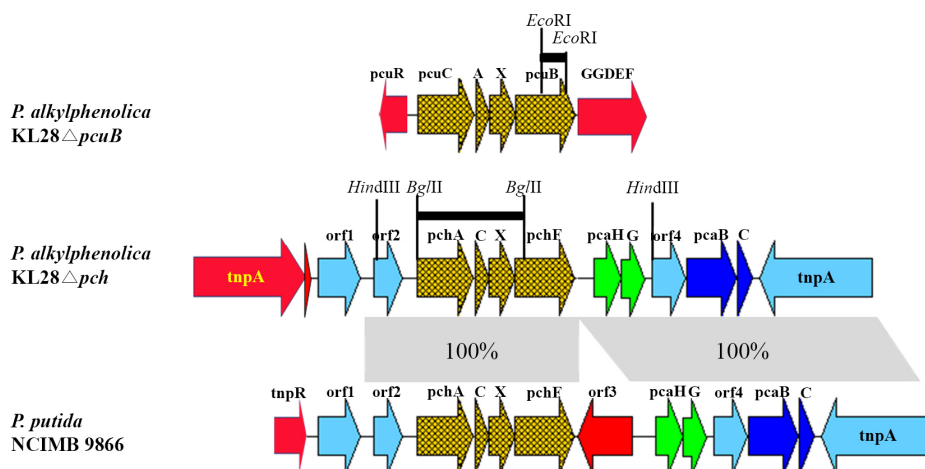


Fig. 2. The *pcu* and *pch* gene clusters in *P. alkylphenolia* KL28. The *pch* gene cluster from *P. putida* NCIMB 9866 is also shown for comparison. A black bar in each gene cluster denotes the deleted portion in the mutant. The restriction sites discussed in the text for mutagenesis are also indicated.

서 분리된 기존 *P. alkylphenolia*가 새롭게 명명된 신종으로, *mucA* 변이주는 의학적으로 중요한 polymannuronate 다당체를 대량 생산하는 그람 음성 세균이다(Veeranagouda *et al.*, 2011; Mulet *et al.*, 2015). 이 균주는 *p-cresol*을 공기 중으로 공급하면 초기 5-10일 정도까지는 반구(dome) 형태의 집락을 형성하다가, 이후에는 반구에서 높이가 2-4 mm되는 잔가지를 갖는 버섯 모양의 구조체를 형성하는 특별한 발달 단계를 갖는 세균이다. 이 3차원 세포 구조를 공중체(aerial structure)라 명명하였다(Lee and Veeranagouda, 2009; Veeranagouda *et al.*, 2009, 2011). 이 균주는 *para* 또는 *meta* 위치에 알킬 그룹(C₁-C₃)을 갖는 페놀을 대사할 수 있으며, 이들 화합물은 *lap*-유전자군에 암호화되어 있는 *Lap* 분해 경로에 의해 대사된다(Jeong *et al.*, 2003). *lap* 유전자군의 구성 유전자 분포는 단순 페놀 분해균인 *P. putida* CF600에서 발견된 유전자군(*dmp*) 내의 유전자와 조성과 순서에서 차이가 있으며, 개별 유전자의 subcloning을 통한 효소의 기질 특이성 연구에서도 기존 효소와 차이가 있음을 알 수 있었다(Kim *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2009). 또한 기존연구에서 *gfp* 유전자를 포함하는 신규 트랜스포존을 사용하여 *p-cresol*을 *p-hydroxybenzoate*로 분해할 수 있는 *pcuRCAXB*를 동정하였으며, 이 유전자군은 액체 배지에서 서보다 한천배지에서 더 많이 발현되는 것을 보였다(Cho *et al.*, 2011).

본 연구에서는 *P. alkylphenolia* KL28 균주에 존재하는 *p-cresol*의 초기 대사에 관여하는 기존에 알려진 *lap*과 *pcu* 유전자군과 다른 *pch* 유전자군을 동정하였으며, 변이주 및 프로모터의 레포터(reporter) 발현 분석을 통해 이들 3개 유전자군이 *p-cresol* 대사에 관여하는 것을 밝힐 수 있었다.

재료 및 방법

균주와 배지

P. alkylphenolia KL28 (KCTC 22206) 균주는 복합배지로 LB 배지 또는 무기영양배지로 mineral salts basal medium (MSB) (Stanier *et al.*, 1966)을 사용하였다. 배양 온도는 28°C 이었다. 변이주의 성장 정도 및 *gfp* 레포터 유전자의 발현을 실험하기 위해서는 2.5 mM 탄소원(*p-cresol*, *m-cresol*과 포도당)을 포함하는 50 ml의 MSB 배지를 250-ml Erlenmeyer 플라스크에 첨가하여 회전식 교반기에서 160 rpm으로 배양하였다. 이때 LB 액체 배지에서 밤샘 배양한 배양액 20 µl를 접종하여 주어진 배양시간에 따라 시료 채취 후 OD₆₆₀과 GFP 발현량을 측정하였다. *Escherichia coli*는 37°C에서 LB 배지를 이용하

여 배양하였다. 필요한 경우 배지에 한천을 1.5% 첨가하여 한천 배지를 만들거나, 세포 내 플라스미드의 유지를 위해서는 필요한 항생제를 기존에 사용한 농도로 배지에 첨가하였다(Yun *et al.*, 2007).

유전자 조작 및 유전자 상동성 비교

*P. alkylphenolia*로부터 염색체 분리, 제한 효소의 소화, 접합(conjugation) 및 PCR은 기존 실험 방법을 준수하였다(Lee *et al.*, 2014). *P. alkylphenolia*의 유전체의 염기 서열로부터 필요한 유전자 정보를 회수하였으며, Bioedit 프로그램의 BLOSUM62 score matrix (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>)를 이용하여 전사된 단백질 아미노산 서열의 상동성을 조사하였다. *P. alkylphenolia* KL28의 유전체의 서열은 NCBI 참고 번호 NZ_CP009048.1이다. KEGG 데이터베이스(<http://www.genome.jp/kegg>)를 이용하여 특정 단백질에 대한 ortholog와 paralog 단백질을 검색하였다. 유전자 지도는 SimVector 4 프로그램을 사용하여 제작하였다.

P. alkylphenolia KL28 $\Delta lapB$ 변이주의 제작

JJC230xmaF (ATACCCGGGATGGCGATGACAG)와 JJC230hindR (GGCAAGCTTTCAGGTCACAACG) 프라이머를 이용하여 1 kb *lapB* 단편을 PCR 증폭하였다. 이를 pGEM-T easy 벡터(Promega Co.)에 클로닝하였으며, *lapB* 단편의 가운데에 존재하는 *PstI* 자리에 전사 종결이 제거된 테트라시클린 내성 유전자인 Tc2 유전자를 클로닝하여 pGEM-T easy-*lapB*::Tc2를 제작하였다. Tc2 유전자 카세트는 기존 p34S-Tc2 (Veeranagouda *et al.*, 2011)로부터 *PstI* 소화 후에 회수하였다. 다음으로 pGEM-T easy-*lapB*::Tc2 벡터를 *HindIII*/*EcoRI*으로 소화한 후에 *Pseudomonas*에서는 복제가 되지 않는 자살 벡터인 pK18mobsacB (Schafer *et al.*, 1994)의 같은 제한효소 자리에 클로닝하여 pK18mobsacB-*lapB*::Tc2를 제작하였다. *E. coli* DH5α에 존재하는 pK18mobsacB-*lapB*::Tc2를 조력자 *E. coli* DH5α (pRK2013)를 이용하여 3균주의 짝짓기(triple mating)를 통해 *P. alkylphenolia* KL28에 접합으로 도입한 후 암피실린과 테트라시클린을 포함하는 LB 배지에 도말하여 *P. alkylphenolia* KL28*lapB*::Tc2($\Delta lapB$)를 선별하였으며 PCR을 통해 변이주를 확인하였다(Lee *et al.*, 2014).

P. alkylphenolia KL28 $\Delta pcuB$ 와 $\Delta lapB \Delta pcuB$ 변이주의 제작

*gfp*를 갖는 신규 트랜스포존으로 제작된 *P. alkylphenolia*

CI5 변이주(Cho *et al.*, 2011)에서 염색체를 회수 후 *NruI*으로 소화하여 *E. coli*의 *oriR6K* 복제기점을 갖는 self-ligation된 플라스미드인 pSH5를 제작하였으며, 이를 *SalI* 소화 후에 2.5-kb의 *pcuB*를 포함하는 부분을 회수하여 Tc 유전자 카세트를 *SalI* 소화로 제거한 p34S-Tc (Dennis and Zylstra, 1998)에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 p34S-*pcuB*를 *EcoRI* 소화와 self-ligation을 통해 *pcuB* 유전자 내부의 *EcoRI*을 포함하는 단편(Fig. 2)을 제거하였다. 이 벡터를 다시 *SalI*으로 소화하여 내부가 제거된 *pcuB* 유전자를 회수하여 pK18mobsacB의 *SalI*에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 벡터는 pK18mobsacBΔ*pcuB*라 명명하였으며 위에서 언급한 방법과 같이 3균주 짝짓기를 통한 접합으로 KL28균에 도입하여 이중 교차(double crossover) 변이주를 선별하였다. KL28 균주에서 *pcuB*가 제거된 것을 PCR로 확인하였으며 *pcuB*가 제거된 부위는 Fig. 2와 같다. 또한 pK18mobsacBΔ*pcuB*를 Δ*lapB* 변이주에 도입하여 Δ*lapB*Δ*pcuB* 변이주를 제작하였다.

P. alkylphenolica KL28 Δ*lapB*Δ*pcuB*Δ*pch* 변이주의 제작

p-Cresol 분해 유전자를 탐색하기 위해 pLAFR3에 클로닝되어 있는 KL28 균주의 유전자 library를 *P. putida* G7.C-1 접합으로 도입 후 *p*-cresol에 성장하는 형질 전환주를 분리하였다(Jeong *et al.*, 2003). *P. putida* G7.C-1은 *p*-cresol을 탄소원으로 이용하지 못한다. 하나의 형질 전환주로부터 플라스미드를 회수하였으며 *HindIII* 소화 후에 6.8 kb 단편(Fig. 2)을 pUC19 (NEB Lab, Co.) 벡터에 클로닝하였다. 이렇게 제작한 벡터를 다시 *BglII*로 소화하여 2.6 kb 내에 존재하는 *pchA*-*pchF*의 일부를 제거하였다(Fig. 2). Self-ligation 후에 *BamHI*과 *EcoRI* 소화하여 획득한 1.6 kb의 단편을 pK18mobsacB에 클로닝하여 접합으로 위에서 제작한 KL28Δ*lapB*Δ*pcuB* 변이주에 도입 한 후에 이중 교차 변이주를 선별하였으며 이를 통해 KL28Δ*lapB*Δ*pcuB*Δ*pch*를 제작하였다.

GFP 발현 레포터 벡터의 제작 및 GFP 발현의 측정

유전자 *pchA*의 프로모터 부위를 P_PchAF_H (CTGAAGC TTAGCGTACCGCTGTAG)와 P_PchAR_E (ACGGAATTC ACCGCGCATCAGTAG) 프라이머를 사용하여 0.6 kb를 PCR로 증폭한 후에 pGEM T-easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 확인하였다. 이를 다시 *HindIII*/*EcoRI* 소화 후에 *gfp* 유전자를 레포터로 갖는 프로모터 탐색 벡터 pPROBE-GT (Miller *et al.*, 2000)에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 벡터를 ppchA_F-*gfp*라 명명하였으며 접합으로 *P. alkylphenolica* KL28에 도입하

여 여러 탄소원에 대한 *gfp* 발현량을 조사하였다. 염색체의 *pcuB* 유전자에 *gfp*를 포함하는 트랜스포존 변이주 CI5 (Cho *et al.*, 2011)는 *pcu* 오페론의 프로모터가 *pcuC* 유전자 앞에 존재하므로 본 논문에서는 *P. alkylphenolica* KL28 (*CpcuC_p-gfp*) 균주로 명명하였다. 또한 기존에 구축된 *lap* 프로모터의 *gfp* 레포터인 pJJR1 (Jeong *et al.*, 2003)은 위의 레포터 벡터와 쉽게 비교하기 위해 *plapB_p-gfp*라 다시 명명하였다. GFP 형광 발현을 측정하기 위해 세포를 원심분리로 회수하여 OD₆₆₀이 0.1 이되게 멸균된 식염수로 조정 한 후 분광형광계(Shimadzu Co., model RF-5391PC)를 사용하여 450 nm 빛을 조사하여 509 nm에서 발생하는 형광량을 측정하였다. 이때 빛의 조사와 형광량 검출을 위한 파장의 범위(split)는 모두 3 nm이었다. 세포 단위가 갖는 형광의 양은 specific GFP로 계산하였으며 이는 측정 한 형광량을 OD₆₆₀값으로 나누어 계산하였다.

결과 및 고찰

P. alkylphenolica KL28 유전체에 존재하는 *p*-cresol 대사 유전자의 특성

본 연구실에서는 *P. alkylphenolica* KL28 균주의 *p*-cresol 분해 유전자 군으로 *lap*과 *pcu* 유전자군을 동정하였다(Jeong *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2011). *lap* 유전자 군은 *p*-cresol 뿐만 아니라 알킬 체인의 탄소 수가 5개까지도 수용 가능한 다양한 분자량의 알킬 페놀류를 분해하는 것으로 알려져 있다. 이 Lap 분해 경로는 *lapKLMNIOP* (유전체 tag 번호, PSAKL28_05870~PSAKL28_05920) 유전자에 의해 암호화되어 있는 다성분 phenol hydroxylase (Lee, 2013)에 의해 알킬페놀이 4-alkylcatechol로 전환되고 extradiol catechol dioxygenase (*lapB*, PSAKL28_05860)에 의해 방향족 고리의 *meta* 분해를 통해 더욱 분해되는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). *P. alkylphenolica* KL28 균주의 *pcu* 유전자군(*pcuRCAXB*, PSAKL28_20230~20190)은 조절 유전자를 포함하여 *p*-cresol을 *p*-hydroxybenzoate로 분해하는 유전자만 독립적으로 존재하고 있어, 기존에 밝혀진 *p*-cresol 분해 유전자군과는 차이가 있음을 알 수 있었다.

최근에 밝혀진 *P. alkylphenolica* KL28 균주의 유전체 분석을 통해 유전자 부위 PSAKL28_31420~31340에 *p*-cresol을 protocatechuate를 통해 β-carboxy-*cis*,*cis*-muconate로 전환을 촉매 할 수 있는 효소를 암호화하는 유전자군(*pchACXF*-*pcaHG-orf4-pcaBC*)이 존재하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 본 유전자 군 내에 존재하는 *p*-cresol을 *p*-hydroxybenzoate로 분해하는 유전자를 *pcu* 유전자군과 구분하기 위해 *pchACXF*로 명명하

였다. 이 유전자군은 최근에 밝혀진 *P. putida* NCIMB 9866의 85-kb의 pRA4000 플라스미드에 존재하는 염기서열과 100%, *P. putida* NCIMB 9869의 pRA500의 유전자와는 99% 상동성을 보였다. 그러나 NCIMB 9866 유전자 군 내에는 *P. alkylphenolica* 유전자군과 달리 기능이 알려져 있지 않은 *orf3* 유전자가 *pchF* 유전자 다음에 삽입되어 있다(Chen *et al.*, 2014)(Fig. 2). 참고로 *P. alkylphenolica* KL28 내에는 플라스미드가 존재하지 않는다. *P. putida* NCIMB 9866과 9869 균주는 P. J. Chapman 박사가 1966년 영국의 Hull 대학교의 강변에서 분리한 균주이다(NCIMB culture collection). 기원이 다른 *Pseudomonas* 사이에 존재하는 *pch* 유전자의 높은 상동성은 이들 유전자 군이 진화적으로 멀지 않은 시간에 중간 이동(horizontal gene transfer)이 있었다는 것을 알려주고 있다. 이들 유전자군 외부에 *tnpA* (transposase)와 *tnpR* (resolvase)이 존재하고 있어 이들 유전자의 전달을 용이하게 하였을 것으로 추정된다(Fig. 2). 반면에 전사된 단백질의 아미노산 서열에서 PcuC/PchA, PcuA/PchC, PcuX/PchX, PcuB/PchF는 각각 79.0, 59.0, 48.7과 79.9%의 상동성을 보여, *pch*와 *pcu* 유전자들은 보다 오랜 시간 독립적으로 존재해온 것으로 판단된다.

P. alkylphenolica KL28 유전체를 분석을 통해 그 외 *p-cresol* 대사에 관여하는 *p*-hydroxybenzoate 3-monooxygenase를 암호화하는 *pobA* (PSAKL28_20260)를 확인할 수 있었고, protocatechuate 3,4-dioxygenase (*pcaHG*)의 작용에 의해 생성된 β -carboxy-*cis,cis*-muconate를 succinyl-CoA와 acetyl-CoA로 전환하는 β -ketoadipate 분해 경로의 나머지 효소를 암호화하는 독립된 유전자군 *pcaIJFTBDC* (PSAKL28_09980~10040)을 확인할 수 있었다. β -Ketoadipate 대사에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자군은 세균에 따라 다양한 유전자 조합을 갖고 있다. *P. alkylphenolica* KL28에서 발견되는 유전자 조합은 *P. aeruginosa* PAO1과 동일한 유전자 순서를 갖고 있는 것을 알 수 있었다(Li *et al.*, 2010). 이상의 결과에서 보면 KL28 균주는 *p-cresol*을 이용하는 하기 위해 *lap* 유전자군을 이용한 *meta* 분해 경로와 β -ketoadipate 분해 경로를 동시에 갖고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 1). 더욱이 *p-cresol*을 *p*-hydroxybenzoate로 대사하기 위해 2가지의 서로 다른 유전자 군을 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

lap, *pcu*, *pch* 유전자의 *p-cresol* 대사에서의 역할 및 발현 특성

p-Cresol 분해에 이들 3개 유전자군의 역할을 알아보기 위해 재료 및 방법에서처럼 각 유전자군의 변이주를 제작하여 *p*-및 *m-cresol*을 탄소원으로 첨가한 MSB 배지에서 성장 유형을 살펴보았다(Fig. 3). *p-Cresol*을 탄소원으로 제공한 경우 *lap*

유전자가 결손된 변이주는 모균과 동일한 성장을 보였다. 이때 배가시간(doubling time)은 약 3.2 시간이었다. 그러나 *pcuB* 변이주의 배가시간은 약 5.6시간으로 *p-cresol*을 탄소원으로 이용하지만 성장이 지연되는 것을 알 수 있었다. *lapB*와 *pcuB* 동시 변이주는 *pcuB* 변이주보다 낮은 광학밀도를 유지하였지만 거의 동일한 성장을 보였다. 그러나 *lapB/pcuB/pch* 변이주는 *p-cresol*에서 성장을 보이지 않았다(Fig. 3A). 기존 연구에서 전체 *lap* 유전자군을 포함하는 *P. putida* G7.C-1(pJJ2)가 *p-cresol*에 대한 성장을 획득하였고(Jeong *et al.*, 2003), catechol류의 *meta* 분해에 의해 생기는 연노랑색이 *p-cresol*을 포함하는 배양액에 축적되는 것이 관찰되었다(Cho *et al.*, 2011). 따라서 *lap* 유전자군도 *p-cresol*의 분해에 관여하는 것을 알 수 있었다. 그러나 *lap* 변이주가 모균과 유사한 성장 속도를 보이는 것으로 보아 *lap* 유전자군은 액체배지에서 *p-cresol* 분해에 크게 기여하지 않는 것으로 보였다. *p-Cresol*의 구조 이성질체인 *m-cresol*은 모균과 *lapB* 유전자가 변이되지 않은 균주에서만 성장을 하는 것으로 보아 *m-cresol*은 *lap* 유전자군에 절대적으로 의존하는 것을 다시 확인할 수 있었다. 이때 배가시간은 약 7.2시간이었다(Fig. 3B).

액체배지 배양 시 유전자의 발현 정도를 비교하기 위해 *gfp* 레포트 벡터를 사용하여 *p-cresol* 분해 유전자군의 발현 특성을 살펴보았다(Fig. 4). *pch* 유전자는 포도당을 탄소원으로 이용할 경우 미량 발현되는 반면, *p-cresol*에 의해 강하게 발현되

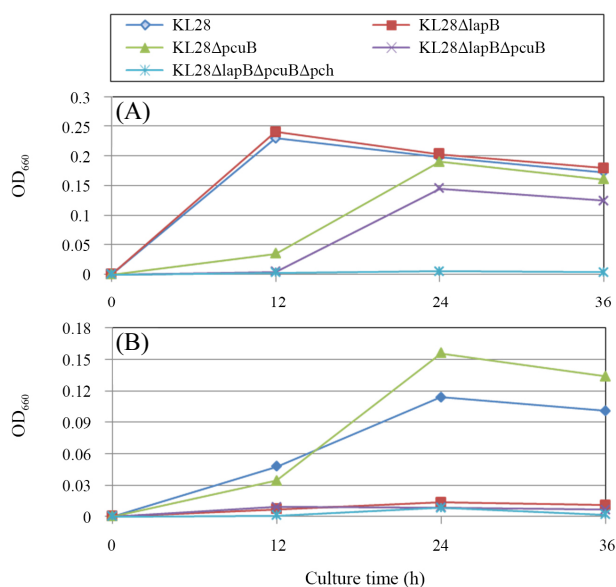


Fig. 3. Growth of *P. alkylphenolica* KL28 and its mutants in the presence of 2.5 mM *p-cresol* (A) and *m-cresol* (B). Experiments were performed in triplicate. The results are mean values and standard deviations were less than 10%.

는 것을 알 수 있었고, 포도당에 의해 *p*-cresol에 의한 발현이 부분적으로 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 4에는 표시하지 않았지만 *p*-cresol을 탄소원으로 사용한 MSB 한천배지에서 specific GFP의 발현은 약 5.5 수준으로 *pch* 유전자가 거의 발현되지 않는 것을 알 수 있었다. 이 값을 액체 배지에서 32.7의 값과 비교하면 *pch* 유전자군은 액체에서 더 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. *pch* 유전자는 *m*-cresol에 의해 유도되지 않았다. 따라서 *pch* 유전자군은 *pcu* 유전자군과는 달리고 액체배지에서 보다 액체배제에서 더 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. *P. alkylphenolica* KL28의 *lap*과 *pcu* 프로모터 부위에는 LysR/XylR-형의 transcriptional regulator를 암호화하는 유

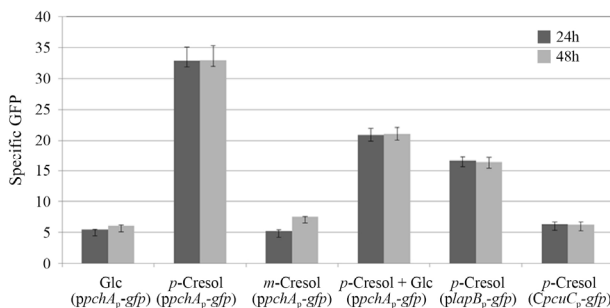


Fig. 4. Specific GFP values from *P. alkylphenolica* containing *gfp* reporters at the culture times of 24 and 48 h. The *gfp* genes under the *pchA* and *lapB* promoters are in plasmid (pProbe-GT) but that under the *pcu* promoter is in chromosome. They are named *ppchA_p-gfp*, *plapB_p-gfp*, and *CpcuC_p-gfp*, respectively. The carbon sources used were Glc (glucose), *p*-cresol and *m*-cresol at the concentration of 2.5 mM. Each data represents three independent experiments with average and standard deviation values.

전자가 존재하며, sigma-54 조절자의 -12/-24의 결합 자리가 보존되어 있다. 하지만 *pchC* 유전자 프로모터에는 이들이 관찰되지 않아 *pch* 유전자군의 발현은 *pcu/lap* 유전자 군과 다른 조절 단백질로부터 발현 조절을 받는 것으로 추정되며, 향후 조절 단백질의 동정 및 조절 기작에 대한 추가 연구가 진행될 예정이다.

액체 배지에서 *p*-cresol에 의한 *lap* 유전자의 발현은 *pch* 유전자 발현의 약 51.5%이므로 다소 약하게 발현되는 것을 알 수 있었다. *pcu* 유전자의 발현은 벡터가 아닌 유전체에 *gfp* 유전자가 삽입되어 있어 측정된 값으로 상대적 비교는 어렵지만, *lap*과 *pch* 발현에 사용된 pPROBE-GT 벡터는 pACYC184의 복제 기점(pVS1/p15a replication origin)을 사용하므로 대장균 세포에는 18개 복제가 존재하는 것으로 알려져 있다(Chang and Cohen, 1978). 이를 고려하면 액체 배지에서도 *pch*와 *lap* 유전자보다 *pcu*가 높게 발현되는 것을 예측할 수 있었다. 또한 *pcu* 유전자를 변이시키면 *lap* 유전자를 변이시킬 때보다 성장의 저해가 높게 나타나는 것으로 보아 액체 배지에서도 *pcu* 유전자의 발현이 *p*-cresol 분해에 큰 역할을 하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

고체 배지에서 각 유전자군에서 나오는 GFP의 발현뿐 아니라 *pcu* 변이주에 의한 공중체 형성 여부를 부가적으로 조사하였다. MSB 한천 배지에 각 균주를 도말한 후 Duran관 속의 솜에 *p*-cresol을 첨가하여 파라필름으로 밀봉한 페트리디쉬에 한 달 동안 배양한 결과는 Fig. 5와 같으며, GFP는 *lap* → *pch* → *pcu* 순으로 높게 발현되는 것을 알 수 있었다. 특히 앞에서

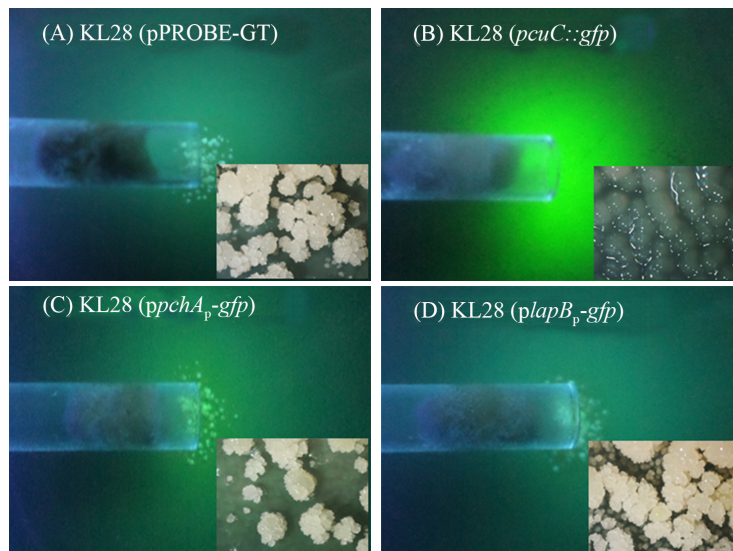


Fig. 5. Photographs showing the levels of GFP expression from the promoter reporters following incubation at 25°C for one month. The tubes contain cotton with 50 μ l *p*-cresol for vapor supply. The diameter of the tubes is 6 mm. The insets are enlarged photographs of aerial structures formed under each tube. All photographs were taken under a UV light at 366 nm from the top of the plates using a Nikon SMZ1500 stereomicroscope.

언급했듯 *lap*과 *pch*의 *gfp* 레포터 유전자가 벡터에 클로닝된 것과 달리 *pcu* 유전자의 *gfp* 레포터는 염색체에 삽입되어 있는 것을 고려하면, *pcu* 유전자가 *pch*와 *pcu*에 비해 월등히 높게 발현되는 것을 알 수 있었다. 또한 *pcu* 유전자가 결핍되면 미세 가지를 갖는 완성된 버섯모양의 공중체는 형성되지 않고 바닥에서 반구 형태의 표면이 부드러운 집락이 형성되었다(Fig. 5). 이는 *pcu* 유전자의 기능이 저해됨에 따라 *p-cresol*의 이용 속도가 줄었기 때문으로 분석되었다. 따라서 버섯형태의 3차 구조 형성은 탄소원의 이용 속도와도 밀접한 관계가 있음을 암시하였다.

P. alkylphenolica KL28의 다양한 *p-cresol* 분해 경로의 활용

본 연구 결과를 통해 3개의 *p-cresol* 분해 유전자군이 *P. alkylphenolica* KL28에 존재하며 기능적으로 작용하는 것을 보였다. 같은 탄소원에 대해 2개의 분해 경로를 갖는 균주는 드물게 발견되나 3가지의 분해 경로를 갖는 균주는 흔하지 않다(Naessens and Vandamme, 2003). *P. alkylphenolica* KL28 내에 *p-cresol*을 이용하는 다양한 분해 경로가 존재하는 것은 변화하는 환경에 적응하면서 주어진 탄소원을 효율적으로 사용하기 위한 것으로 여겨진다. 이를 뒷받침하기 위한 예로 *P. alkylphenolica* KL28의 *pcu* 유전자는 액체 배지에서보다 한천 배지에서 월등히 높게 발현되는 것을 보였다(Cho *et al.*, 2009). 이번 연구 결과에서는 *pch* 유전자군은 고체 배지 보다는 액체 배지에 더 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. *P. alkylphenolica*는 보다 빠른 기질의 이용을 위해 *meta*와 *ortho* 분해 경로 뿐 아니라, *ortho* 분해 경로를 위해 *pch*와 *pcu* 유전자를 동시에 갖도록 진화한 것으로 추정된다(Fig. 1). 또한 *pcu*와 *pch*에서 발현되는 *p-cresol* methylhydroxylase와 *p-hydroxybenzaldehyde* 탈수소효소는 같은 반응을 촉매하는 isozyme으로 두 종류의 효소는 반응학적인 측면(K_m 과 V_{max} 등)에서 차이가 날 수 있어, *P. alkylphenolica* KL28는 다양한 농도가 주어지는 환경에서 효율적으로 *p-cresol*을 탄소원 및 에너지원으로 사용 가능할 것으로 추정된다. 또한 *p-cresol* methylhydroxylase인 PcuAB와 PchCF subunit 간의 치환이 가능하다면 4가지 형태의 조합을 갖는 효소 생산이 가능하다. 특히 *p-cresol*은 미생물 소독제로 미생물에 높은 독성을 보인다. *p-Cresol* 분해를 위한 다양한 효소의 발현은 기질의 무독화에도 크게 기여할 것으로 간주된다. *P. alkylphenolica* KL28는 건조에 내성을 갖는 공중체를 형성하므로 돼지 사육장이나 *p-cresol*이 방출되는 대기 환경을 정화하기 위한 필터 첨가제 등 생분해 목적으로 응용될 수 있으며, *p-cresol* 생분해 효율을 3종류 유전자군의 과발현을 통해 더욱 증대시킬 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 *p-cresol* 초기 분해에 관여하는 기존의 *lap*과 *pcu* 유전자군 외에 새로운 *pch* 유전자군을 *Pseudomonas alkylphenolica* KL28로부터 동정하였다. 이 유전자군(*pchACXF-pcaHG-orf4-pcaBC*)은 *p-cresol*을 β -carboxy-*cis,cis*-muconate로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 암호화하는 것을 알 수 있었다. 이 유전자 군은 영국에서 분리된 *Pseudomonas putida* NCIMB 9866과 9869의 plasmid에서 유래된 *pch* 유전자 군과 동일하여, 이들 유전자군은 중간 horizontal gene transfer로 전달되었을 가능성을 제시하였다. 각 유전자군의 관련 유전자의 변이와 *gfp* 레포터를 갖는 프로모터의 발현 분석을 통해 3개의 분해 유전자군이 모두 *p-cresol*의 분해에 관여하는 것을 알 수 있었으며, *pch* 유전자는 *p-cresol*에 의해 유도되며, 고체 및 액체 배지에서도 *pcu* 유전자군이 가장 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *pcu* 유전자 변이주는 *p-cresol*을 이용하여 버섯모양의 공중체(aerial structure) 형성하지 않았으므로, 탄소원의 이용 속도가 다세포 구조 형성에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나임을 알 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 2015-2016년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원으로 수행된 연구결과입니다. 변이주 제작에 참여한 임은진, 조아라양에게 감사드립니다.

References

- Bayly, R.C., Dagley, S., and Gibson, D.T. 1966. The metabolism of cresols by species of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **101**, 293-301.
- Chang, M.C., Chang, H.H., Chan, C.P., Yeung, S.Y., Hsien, H.C., Lin, B.R., Yeh, C.Y., Tseng, W.Y., Tseng, S.K., and Jeng, J.H. 2014. *p-Cresol* affects reactive oxygen species generation, cell cycle arrest, cytotoxicity and inflammation/atherosclerosis-related modulators production in endothelial cells and mononuclear cells. *PLoS One* **9**, e114446.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Chen, Y.F., Chao, H., and Zhou, N.Y. 2014. The catabolism of 2,4-xyleneol and *p-cresol* share the enzymes for the oxidation of para-methyl group in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1349-1356.
- Cho, J.H., Jung, D.K., Lee, K., and Rhee, S. 2009. Crystal structure and

- functional analysis of the extradiol dioxygenase LapB from a long-chain alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34321–34330.
- Cho, A.R., Lim, E.J., Veeranagouda, Y., and Lee, K.** 2011. Identification of a *p*-cresol degradation pathway by a GFP-based transposon in *Pseudomonas* and its dominant expression in colonies. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1179–1183.
- Cunane, L.M., Chen, Z.W., Shamala, N., Mathews, F.S., Cronin, C.N., and McIntire, W.S.** 2000. Structures of the flavocytochrome *p*-cresol methylhydroxylase and its enzyme-substrate complex: gated substrate entry and proton relays support the proposed catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **295**, 357–374.
- Dagley, S. and Patel, M.D.** 1957. Oxidation of *p*-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **66**, 227–233.
- Dennis, J.J. and Zylstra, G.J.** 1998. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2710–2715.
- Jeong, J.J., Kim, J.H., Kim, C.K., Hwang, I., and Lee, K.** 2003. 3- and 4-alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain KL28: genetic organization of the *lap* gene cluster and substrate specificities of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase. *Microbiology* **149**, 3265–3277.
- Joesaar, M., Heinaru, E., Viggor, S., Vedler, E., and Heinaru, A.** 2010. Diversity of the transcriptional regulation of the *pch* gene cluster in two indigenous *p*-cresol-degradative strains of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 464–475.
- Kim, J., Fuller, J.H., Cecchini, G., and McIntire, W.S.** 1994. Cloning, sequencing, and expression of the structural genes for the cytochrome and flavoprotein subunits of *p*-cresol methylhydroxylase from two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **176**, 6349–6361.
- Kim, J.Y., Kim, J.K., Lee, S.O., Kim, C.K., and Lee, K.** 2005. Multicomponent phenol hydroxylase-catalysed formation of hydroxyindoles and dyestuffs from indole and its derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**, 163–168.
- Kukor, J.J. and Olsen, R.H.** 1992. Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol/cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and functional analysis of the encoded enzyme. *J. Bacteriol.* **174**, 6518–6526.
- Lee, K.** 2013. Construction of overexpression vectors and purification of the oxygenase component of alkylphenol hydroxylase of *Pseudomonas alkylphenolia*. *Korean J. Microbiol.* **49**, 95–98.
- Lee, K., Lim, E.J., Kim, K.S., Huang, S.L., Veeranagouda, Y., and Rehm, B.H.** 2014. An alginate-like exopolysaccharide biosynthesis gene cluster involved in biofilm aerial structure formation by *Pseudomonas alkylphenolia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4137–4148.
- Lee, K. and Veeranagouda, Y.** 2009. Ultramicrocells form by reductive division in macroscopic *Pseudomonas* aerial structures. *Environ. Microbiol.* **11**, 1117–1125.
- Li, D., Yan, Y., Ping, S., Chen, M., Zhang, W., Li, L., Lin, W., Geng, L., Liu, W., Lu, W., and Lin, M.** 2010. Genome-wide investigation and functional characterization of the beta-ketoadipate pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Microbiol.* **10**, 36.
- Miller, W.G., Leveau, J.H., and Lindow, S.E.** 2000. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 1243–1250.
- Mulet, M., Sanchez, D., Lalucat, J., Lee, K., and Garcia-Valdes, E.** 2015. *Pseudomonas alkylphenolia* sp. nov., a bacterial species able to form special aerial structures when grown on *p*-cresol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4013–4018.
- Naessens, M. and Vandamme, E.J.** 2003. Multiple forms of microbial enzymes. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1119–1124.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Shingler, V., Powlowski, J., and Marklund, U.** 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**, 711–724.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M.** 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159–271.
- Veeranagouda, Y., Basavaraja, C., Bac, H.S., Liu, K.H., and Lee, K.** 2011. Augmented production of poly-β-D-mannuronate and its acetylated forms by *Pseudomonas*. *Process Biochem.* **46**, 328–334.
- Veeranagouda, Y., Lee, K., Cho, A.R., Cho, K., Anderson, E.M., and Lam, J.S.** 2011. Ssg, a putative glycosyltransferase, functions in lipo- and exopolysaccharide biosynthesis and cell surface-related properties in *Pseudomonas alkylphenolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **315**, 38–45.
- Veeranagouda, Y., Lim, E.J., Kim, D.W., Kim, J.K., Cho, K., Heipieper, H.J., and Lee, K.** 2009. Formation of specialized aerial architectures by *Rhodococcus* during utilization of vaporized *p*-cresol. *Microbiology* **155**, 3788–3796.
- Wright, A. and Olsen, R.H.** 1994. Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 235–242.
- Yan, Z., Wei, X., Yuan, Y., Li, Z., Li, D., Liu, X., and Gao, L.** 2016. Deodorization of pig manure using lignin peroxidase with different electron acceptors. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **66**, 420–428.
- Yun, J.I., Cho, K.M., Kim, J.K., Lee, S.O., Cho, K., and Lee, K.** 2007. Mutation of *rpoS* enhances *Pseudomonas* sp. KL28 growth at higher concentrations of *m*-cresol and changes its surface-related phenotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **269**, 97–103.