The Korean Journal of Microbiology, Vol. 33, No. 2, June 1997, p. 92-96
Copyright©1997, The Microbiological Society of Korea

Pseudomonas sp. Strain DJ77에서 *phnF* 유전자의 구조

이성훈 · 김성재 · 신명수 · 김치경 · 임재윤 · 이기성[1] · 민경희[2] · 김영창*

충북대학교 생명과학부, [1]배재대학교 생물학과, [2]숙명여자대학교 생물학과

***Pseudomonas* sp. strain DJ77로부터 클로닝한 catechol 분해와 관련된 *phnDEFG* 유전자들이 존재하는 pHENX 7에서 *phnF* 유전자의 염기서열을 밝혔다. Extradiol dioxygenase 유전자인 *phnE*와, 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase를 생산하는 *phnG* 유전자 사이에 존재하는 유전자 *phnF*는 432 bps로된 하나의 open reading frame(ORF)으로 존재하였고, 여기서 유추한 아미노산은 143개로 분자량 13,859 dalton의 polypeptide를 만들어 내고 있다. *phnF* 유전자는 *Sphingomonas* sp. strain HV3 catE 유전자 부위와 *Sphingomonas yanoikuyae* B1의 *xylE*와 *xylG* 사이에 존재하는 ORF 부위의 염기서열과 각각 99%, 68.6%의 상동성을 가지고 있었다. 또한 PhnF 단백질의 아미노산서열은 *Citrobacter freundii* DSM30040의 *orfY* 부위의 아미노산서열과 62.3%의 상동성이 있었다.**

KEY WORDS *Pseudomonas* sp. strain DJ77, *phnF* gene

탄화수소 분해와 관련된 많은 유전자들은 대부분 군을 이루어 존재하고 있다. 또한 하나의 유전자군 안에서도 분해경로와 연관되어 유전자가 위치하고 있는 경우가 많다. Catechol-2,3-dioxygenase(C23O)와 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase(2HMSD), 그리고 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase(2HMSH)는 catechol 분해경로에서 서로 이웃하고 있는 단계에 각각 작용하는 효소들인데(Fig. 1), 실제로 naphthalene 분해 균주인 *Pseudomonas putida* NCIB9816과 xylene 분해균주인 *P. putida* TOL plasmid pWW0, 그리고 phenol 분해균주인 *Pseudomonas* sp. CF600에서 이들 유전자의 순서는 C23O-2HMSD-2HMSH(각각 *nahH-nahI-nahN*, *xylE-xylG-xylF*, 그리고 *dmpB-dmpC-dmpD*)로 구성되어 있다(1, 3).

Pseudomonas sp. strain DJ77(4)로부터 클로닝한 재조합 plasmid pHENX7에는 catechol 분해와 관련된 유전자들이 존재하고 있다. 지금까지 연구에서 밝혀진 것처럼 *phnE* 유전자는 catechol-2,3-dioxygenase의 활성을 나타내고 있으며, *phnE* 유전자의 바로 상류부분에 2HMSH를 암호화하고 있는 *phnD* 유전자가 존재한다(6). 2HMSD를 생산하는 *phnG* 유전자는 *phnE* 유전자의 하류방향으로 500 bps 정도 떨어져서 위치하고 있다. *phnF* 유전자는 *phnE* 유전자의 하류쪽에 위치한 1.2-kb의 *Pst*I-*Hin*dIII 절편을 가지고 있는 pPH12에서 약 15 kDa의 단백질을 합성하는 것으로 확인되었다. 따라서 *Pseudomonas* sp. strain DJ77에서도 앞에서와 비슷하게 2HMSH-C23O-2HMSD의 순서로 유전자가 위치하고 있으며, 특이한 것은 *phnF* 유전자가 C23O와 2HMSD 사이에 존재한다는 것이다(5).

유전자군에 있는 유전자들이 각각 나름대로의 기능을 수행하고 있는 것으로 미루어볼 때 *Pseudomonas* sp. strain DJ77의 유전자군에 끼어있는 *phnF* 유전자도 이 유전자군의 다른 유전자들처럼 phenanthrene 분해에 특정 기능을 수행할 것으로 추정할 수 있다. 본 연구에서는 *phnF* 유전자 부위의 염기서열을 결정하여 *phnF* 유전자의 존재를 확인하고, 이것으로부터 다른 균주들과의 염기서열 혹은 아미노산서열의 상동성을 조사하여 상관관계를 살펴보며, 아울러 효소적인 기능도 알아보았다.

*To whom correspondence should be addressed

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 이미 보고한 바 있는 *Pseudomonas* sp. strain DJ77(4)이다. 형질전환을 위한 숙주로는 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고, cloning vector로는 pBLUESCRIPT SK(+) phagemid(Stratagene)를 사용하였다. 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. 완전 배지로는 LB(Luria-Bertani)배지를 사용하였다.

DNA 추출 및 조작

Pseudomonas sp. strain DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy(9) 등의 방법에 따라 추출하였으며 plasmid DNA는 Sambrook(7) 등의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한 효소 및 T4 DNA ligase 등은 Boehringer Mannheim, POSCOCHEM (남도과학), 그리고 New England Biolab 등으로부터 구입하여 사용하였으며, 반응조건은 제조회사의 처방에 따랐다.

염기서열 결정

Sequenase version 2.0 kit(USB)를 사용하여 Sanger(8) 등의 dideoxy-mediated chain termination 방법으로 *phnF* 유전자 부위의 염기서열을 결정하였다. 5'쪽은 pSE175를 reverse primer(5'-TTCACACAGGAAACAG-3')와 -40 primer(5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3')를 이용하여 양쪽 방향으로 sequenc-

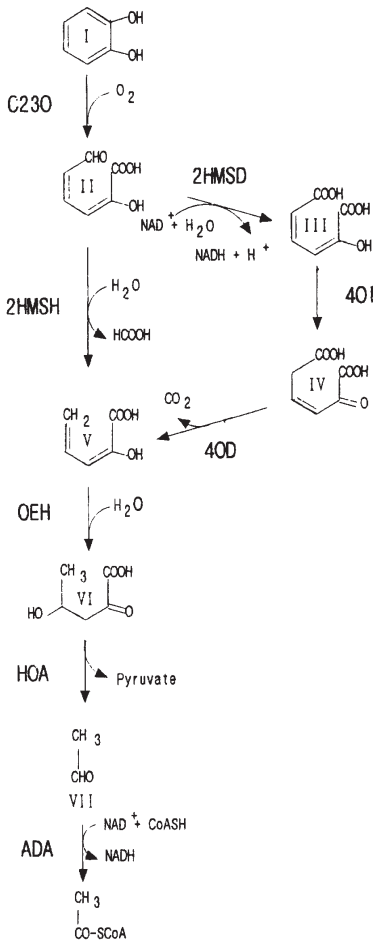

Fig. 1. Catabolic pathway for the dissimilation of catechol. Compounds: I, catechol; II, 2-hydroxymuconic semialdehyde; III, 4-oxalocrotonate, enol form; IV, 4-oxalocrotonate, keto form; V, 2-Oxopent-4-enoate; VI, 4-hydroxy-2-oxovalerate; VII, acetaldehyde. Enzymes: C23O, catechol-2,3-dioxygenase; 2HMSD, 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase; 2HMSH, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase; 4OI, 4-oxalocrotonate isomerase; 4OD, 4-oxalocrotonate decarboxylase; OEH, 2-oxopent-4-enoate hydratase; HOA, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase; ADA, acetaldehyde dehydrogenase (acylating).

ing하였으며, 3'쪽은 pHY2E를 reverse primer로 sequencing하였다. 또한 SK(+) vecter가 phagemid이므로 helper phage인 KO7을 이용하여 single strand DNA를 추출하여 주형으로 사용, sequencing하였다.

Catechol 2,3-dioxygenase 활성

항생제(Ampicillin, 100 μg/ml)가 들어 있는 고체 배지에 균을 도말하여 하룻밤 동안 배양하였다. 생성된 colony 위에 100 mM catechol을 살포함으로써 노란색 화합물(2-hydroxymuconic semialdehyde)의 생성속도를 측정하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains of plasmids	Descriptions	Sources
Strains		
Pseudomonas sp. DJ77	Grows with phenanthrene, 4-chlorobiphenyl and benzoate	4
E. coli XL1-Blue	*supE44hsdR17recA1endA1gyrA 46thirelA1lac* Δ(*lac*⁻ *proAB*) *F'[proAB⁺lacI^q lacZ*ΔM15Tn10(*tet*)]	
Plasmids		
pBluescript SK(+)	Ap^r cloning and sequencing vector	Stratagene
pHENX7	6.8 kb XhoI fragment from DJ77 inserted into SK(+)	5
pSH15	1.5 kb *Sal*I-*Hin*dIII fragment of pHENX7 in SK(+)	5
pPE17	1.7 kb *Pst*I-*Eco*RI fragment of pHENX7 in SK(+)	5
pE3	1.2 kb *Pst*I-*Eco*RI fragment of pPE17 in SK(+)	This work
pPH22	2.2 kb *Pst*I-*Hin*dIII fragment of pHENX7 in SK(+)	This work
pPH12	1.2 kb *Pst*I-*Hin*dIII fragment of pPH22 in KS(+)	This work

결과 및 고찰

phnF 유전자의 염기서열

pSE175는 *phnF*의 5'쪽 부위를 포함하고 있으며 약 200 bps 내외의 크기이다. 이것은 한 번에 읽을 수 있는 범위(최대 약 300 bps까지)이나 양쪽 strand를 sequencing하여 비교함으로써 더 정확성을 높였다. pHY2E는 *phnF* 유전자의 3'쪽과 *phnG* 유전자의 5'쪽을 포함하고 있으며, 약 500 bps 내외의 크기이다.

Fig. 2에서 보는 것처럼 유전자 *phnF*는 개시코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)을 가진 432 bps로 이루어진 open reading frame(ORF)이다. Ribosome binding site로 생각되는 염기서열(5'-GGTGA-3')은 이 ORF의 개시코돈으로부터 10 bps앞에 존재하였다. 이 ORF의 G+C 함량은 67.1%로, 유전자 *phnD* (60.5%, submitted)와 *phnE*(57.4%, 6)보다 높았다. 이 ORF에서 유추한 아미노산은 143개이며 이들이 암호화하고 있는 단백질의 분자량은 13,859 dalton으로 전보(5)에서 언급한 바와 같이, PhnF를 갖는 재조합 plasmid pHENX7이나 pPE17 등에서 만들어지는 SDS-PAGE 결과와 거의 일치하였다.

phnF 유전자와 단백질의 상동성 분석

phnF 유전자의 염기서열과 상동성이 있는 다른 균주들을 blastn을 통하여 조사하여 본 결과 비교적 염기서열의 상동성이 높은 균주로는 *Sphingomonas* sp. strain HV3 *catE* 유전자(GenBank accession number L10655)의 하류부위(10)와 *S. yanoikuyae* B1의 *xylE*와 *xylG* 사이에 존재하는 ORF 부위(12)로 각각 99%, 68.6%의 상동성을 가지고 있었다. 특이

```
5′ CGCTTCATGACGGTGAACACCTGATCATGGACGGGGTGGTTTCGGTCCGGACAGTAGGCC      60
                    phnF  M  D  G  V  V  S  V  R  T  V  G  H
   ACGAATTGGCGCTCAAGGCAGCGGCTGCCGCCGTTGCCATGGGTGCGGCGGCGGGCTGTC     120
     E  L  A  L  K  A  A  A  A  A  V  A  M  G  A  A  A  G  C  P
   CGGTCGTTGCCGCGGTGGTCGGCGCGGGGGGAGACCTGGTCGCGTTCGTGCGCGCCAGCG     180
     V  V  A  A  V  V  G  A  G  G  D  L  V  A  F  V  R  A  S  G
   GCTCCCCTTCGCCGTCTGCAAAGATCGCGCAGGACAAGGCTTACAGCGCCGCCAGCTTCC     240
     S  P  S  P  S  A  K  I  A  Q  D  K  A  Y  S  A  A  S  F  R
   GCGTCCCGACGCCGGATCTCTATGCGATGGTTTCGGGCAATCCGGCCTTGCGCGACGGGA     300
     V  P  T  P  D  L  Y  A  M  V  S  G  N  P  A  L  R  D  G  I
   TCGTCGCGCAGCCGGGAATAGCGATGTTCGGCGGCGGCCTACCGATCGAAATTGCCGGTG     360
     V  A  Q  P  G  I  A  M  F  G  G  G  L  P  I  E  I  A  G  E
   AATTCGTCGGTGCGATTGGTATTTCCGGCGGGAGCGAAGCGATGGACGTCGAGTACGCCA     420
     F  V  G  A  I  G  I  S  G  G  S  E  A  M  D  V  E  Y  A  N
   ACGCCGGCCTCGCTGCGATCGGCGCAAGGCAATTCTGACGCCCCATGGGTTCTGGCAAAA 3′ 480
     A  G  L  A  A  I  G  A  R  Q  F  *
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *phnF* of *Pseudomonas* sp. strain DJ77(GenBank accession number U87631). A putative ribosome binding site is underlined. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is also shown.

```
phnF    ATGGACGGGGTGGTTTCGGTCCGGACAGTAGGCCACGAATTGGCGCTCAAGGCAGCGGCT  60
catX    ATGGACGGGGTGGTTTCGGTCCGGACAGTAGGCCACGAATTGGCGCTCAAGGCAGCGGCT  60

phnF    GCCGCCGTTGCCATGGGTGCGGCGGCGGGCTGTCCGGTCGTTGCCGCGGTGGTCGGCGCG  120
catX    GCCGCCGTTGCCATGGGTGCGGCGGCGGGCTGTCCGGTCGTTGCCGCGGTGGTCGGCGCG  120

phnF    GGGGGAGACCTGGTCGCGTTCGTGCGCGCCAGCGGCTCCCCTTCGCCGTCTGCAAAGATC  180
catX    GGGGGAGACCTGGTCGCGTTCGTGCGCGCCAGCGGCTCCCCTTCGCCGTCTGCAAAGATC  180

phnF    GCGCAGGACAAGGCTTACAGCGCCGCCAGCTTCCGCGTCCCGACGCCGGATCTCTATGCG  240
catX    GCGCAGGACAAGGCTTACAGCGCCGCCAGCTTCCGCGTCCCGACGCCGGATCTCTATGCG  240

phnF    ATGGTTTCGGGCAATCCGGCCTTGCGCGACGGGATCGTCGCGCAGCCGGGAATAGCGATG  300
catX    ATGGTTTCGGGCAATCCGGCCTTGCG--ACGGGATCGTCGCGCAGCCGGGAATAGCGATG  300

phnF    TTCGGCGGCGGCCTACCGATCGAAATTGCCGGTGAATTCGTCGGTGCGATTGGTATTTCC  360
catX    TTCGGCGGCGGCCTACCGATCGAAATTGCCGGTGAATTCGTCGGTGCGATTGGTATTTCC  360

phnF    GGCGGGAGCGAAGCGATGGACGTCGAGTACGCCAACGCCGGCCTCGCTGCGATCGGCGCA  420
catX    GGCGGGAGCGAAGCGATGGACGTCGAGT                                  388

phnF    AGGCAATTCTGA                                                  432
```

Fig. 3. Comparison of nucleotide sequence of the *phnF* gene from *Pseudomonas* sp. strain DJ77 with that of the *catX* from *Pseudomonas* sp. strain HV3(GenBank accession number L10655). Identical necleotides between the sequences are indicated by colons.

한 것은 *Sphingomonas* sp. strain HV3 *catE* 유전자 부위로서 *phnF* 유전자와 2개의 결실된 염기부분을 제외하면 100%의 상동성이 있었다(Fig. 3). Blastp를 통하여 조사했을 때에는 *Citrobacter freundii* DSM30040의 *orfY* 부위(GenBank accession number U09771)와 62.8%의 상동성을 발견하였다(Fig. 4). *orfY*는 glycerol 분해에 관여하는 유전자군 중에 1, 3-propanediol dehydrogenase 유전자 *dhaT*와 glycerol dehydratase 유전자 *dhaB* 사이에 위치하고 있는 ORF로 생성 단

```
PhnF-DJ77  MDGVVSVRTVGHELALKAAAAAAVAMGAAAGCPVVAAVVGAGGDLVAFVRA  50
OrfY-DSM   MNKSQQIATITLAAAKKMAQAVEAKALEINVPVVFSVVDHGGNTLLMQRM  50

PhnF-DJ77  SGSPSPSAKIAQDKAYSAASFRVPTPDLYAMVSGNPALRD-GIVAQPGIA  99
OrfY-DSM   DDAFVTSCDISLNKAYTACCLRQGTHEITDAVQPGASLYGLQLTNQQRIV  100

PhnF-DJ77  MFGGGLPIEIAGEFVGAIGISGGSEAMDVEYANAGLAAIGARQF  143
OrfY-DSM   IFGGGLPVILNGKVIGAVGVSGGTVEQDRLLAETALDCFSEL--  142
```

Fig. 4. Amino acid sequence alignments of homologous region of the PhnF and OrfY of *Citrobacter freundii* DSM30040 (GenBank accession number U09771).

백질의 정확한 기능은 아직 보고되지 않았다(2).

탄화수소 분해 관련 유전자군과의 비교

탄화수소 분해에 관여하고 있는 유전자들은 대부분 plasmid 나 chromosome 상에서 하나 혹은 그 이상의 군을 이루어 존재하고 있다. Naphthalene 분해유전자의 경우 naphthalene이 salicylate로 분해되는데 관여하는 효소유전자들이 operon I(또는 upper pathway operon)을 이루고 있으며, salicylate가 pyruvate로 분해되는데 관여하는 효소유전자들이 operon II(또는 lower pathway operon)를 이루고 서로 인접하여 존재한다(11). 또한 이 operon I이나 operon II 등 하나의 유전자군 안에서도 분해경로에 따라서 유전자가 연관되어 위치하고 있는 경우가 대부분이다. Fig. 1에서 보는 것처럼, catechol-2,3-dioxygenase(C23O)와 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase(2HMSD), 그리고 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase(2HMSH)는 catechol 분해경로에서 서로 이웃하고 있는 단계에 각각 작용하는 효소들인데, Fig. 5에서처럼 실제로 naphthalene 분해 균주인 *P. putida* NCIB-9816과 xylene 분해균주인 *P. putida* TOL plasmid pWW0, 그리고 phenol 분해균주인 *Pseudomonas* sp. CF600에서 유전자의 순서는 C23O-2HMSD-2HMSH(각각 *nahH-nahI-nahN, xylE-xylG-xylF,* 그리고 *dmpB-dmpC-dnpD*)로 모두 같은 양상을 보이고 있다(1, 3). 특히 이런 양상은 여러 lower pathway operon 중에서 branch enzyme 즉, 2HMSD를 가지고 4-oxalocrotonate를 만들 수 있는 세균들에서만 볼 수 있을 뿐이다.

전보(5)에서 밝힌 것처럼 *phnF* 유전자의 상류부분에는 2HMSH를 암호화하고 있는 *phnD* 유전자와 catechol-2,3-dioxygenase의 활성을 나타내는 *phnE* 유전자가 위치하고 있으며, 2HMSD를 생산하는 유전자 *phnG*는 *phnF* 유전자의 하류방향에 존재하고 있다. 이렇게 볼 때 DJ77에서 세 유전자의 순서(2HMSH-C23O-2HMSD)는 앞의 세 가지 균주의 예와 다르며, 이것은 탄화수소분해균주들의 진화적인 변화에 의한 차이로 생각할 수 있다. 그러나 유전자 *phnF*가 C23O와 2HMSD의 사이에 위치하는 것이 특이하다. 기본적으로 탄화수소분해경로에 관련된 유전자군에 있는 유전자들이 각각 나름대로의 기능을 수행하고 있는 것으로 미루어 볼 때 *Pseudomonas* sp. strain DJ77의 탄화수소분해 유전자군에 끼어 있는 유전자 *phnF*도 이 유전자군의 다른 유전자들처럼 phenanthrene 분해에 특정 기능을 수행할 것으로 생각된다.

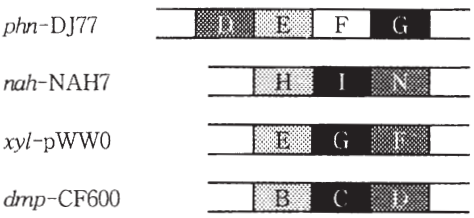

Fig. 5. Organization of *phn* operon in *Pseudomonas* sp. strain DJ77 and comparison with *nah* operon in *Pseudomonas putida* NCIB9816, *xyl* operon in *P. putida* TOL plasmid pWW0, and *dmp* operon in *Pseudomonas* sp. CF600. Enzymes: ▧, Catechol 2,3-dioxygenase; ▩, 2-Hydroxymuconic semialdehyde hydrolase; ■, 2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase.

phnF 유전자의 기능

유전자 *phnF*는 비교적 작은 ORF이고 Fig. 5에서처럼 2-hydroxymu- conic semialdehyde dehydrogenase를 가진 오페론에서만 C23O, 2HMSD, 2HMSH 등 세 개 유전자의 순서가 유지되는 것으로 보아 기능이 있는 유전자일 수도 있지만 기능이 사라진 pseudogene일 수도 있다. 그러나 전보(5)에서 *phnF* 유전자는 이 ORF에 해당하는 polypeptide를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 더욱이 *phnF* 유전자가 유전자군에 의미없이 존재하는 ORF라면 이 부위와 상동성을 갖는 어떤 부위가 다른 세균들에서는 발견되지 않을 가능성이 높다. 그러나 *phnF* 유전자는 *Sphingomonas* sp. strain HV3 *catE* 유전자의 하류부위(10)와 염기서열 상동성을 비교하였을 경우(Fig. 3) 두 개의 염기를 제외하고는 100% 동일하다. 따라서 이런 두 가지 이유에서 유전자 *phnF*가 어떤 기능을 가지고 있다고 볼 수 있다.

phnF 유전자의 기능을 알아보기 위해서 유전자 *phnF*와 *phnE*를 둘 다 가지고 있는 클론 pPH22와 *phnE* 유전자만을 가지고 있는 pPE17에 catechol을 분무하여 노란색 화합물을 합성하는 양상을 비교하였다. 그 결과 pPH22의 경우 catechol 분해양상이 *phnE* 유전자만 있는 pPE17에 비해 노란색 화합물 생성속도가 느린 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과로 볼 때 유전자 *phnF*의 단백질(PhnF)은 catechol 분해에 관여하지 않을까 추측되며, 정확한 작용기작을 이해하기 위하여 현재 실험을 진행 중이다.

감사의 말

이 연구는 교육부 기초과학 연구비(BSRI-94-4432, BSRI-95-4432)로 수행되었습니다.

참고문헌

1. **Bartilson, M., I. Nordlund and V. Shingler.** 1990. Location and gene organization of the dimethylphenol catabolic genes of *Pseudomonas* CF600. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 294-300.
2. **Daniel, R., K. Stuertz and G. Gottschalak.** 1995. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *J. Bacteriol.* **177**, 4392-4401.
3. **Harayama, S., M. Rekik, A. Wasserfallen and A. Bairoch.** 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequence of catechol oxidation genes of pWW0 and NAH7 plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 241-247.
4. **Kim, J.W., C.K. Kim, Y.C. Kim, J.H. Yeum and J.G. Lee.** 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 122-128.
5. **Kim, Y.C., K.S. Youn, M.S. Shin, H.S. Kim, M.S. Park and H.J. Park.** 1992. 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.
6. **Kim, Y.C., M.S. Shin, K.S. Youn, Y.S. Park and U.H. Kim.** 1992. Nucleotide sequence of the *phnE* gene encoding extradiol dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain DJ77. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 8-14.
7. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
8. **Sanger, R., S. Nicklen and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5463.
9. **Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
10. **Yarjala, K., L. Paulin, S. Kilpi and M. Romantschuk.** 1994. Cloning of *cmpE*, a plasmid borne catechol 2,3-dioxygenase encoding gene from the aromatic and chloroaromatic degrading *Pseudomonas* sp. HV3. *Gene.* **138**, 119-121.
11. **Yen, K.M. and I.C. Gunsalus.** 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 874-878.
12. **Zylstra, J.G. and E.B. Kim.** 1995. Molecular and biochemical characterization of two *meta*-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J. Bacteriol.* **177**, 3095-3103.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: Structure and Function of the *phnF* Gene of *Pseudomonas* sp. Strain DJ77

Seong-Hoon Lee, Sungje Kim, Myung-Soo Shin, Chi-Kyung Kim, Jai-Yun Lim, Ki-Sung Lee[1], Kyung-Hee Min[2] and Young-Chang Kim*(School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea; [1]Department of Biology, Pai-Chai University, Taejon 302-735, Korea; [2]Department of Biology, Sookmyung Womens University, Seoul 140-742, Korea)

The 6.8 kb *Xho*I fragment of chromosomal DNA of *Pseudomonas* sp. DJ77 contains the *phnDEFG* genes involved in the degradation of polyaromatic hydrocarbons and chlorinated aromatics. Here, we report the nucleotide sequence of the ORF encoding a polypeptide consisted of 143 amino acids with a *Mr* of 13,859. The nucleotide sequence of the ORF is 99% and 68.6% identical to the downstream region of *catE* of *Sphingomonas* sp. strain HV3 and the ORF between *xylE* and *xylG* of *Sphingomonas yanoikuyae* B1, respectively. The deduced amino acid sequence of the *PhnF* has 62.3% identity with the amino acid encoded by *orfY* region of *Citrobacter freundii* DSM30040. We now confirm that the ORF is located between the catechol 2,3-dioxygenase (C23O), *phnE*, and 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (2HMSD), *phnG*.