

아닐린 분해균주 *Pseudomonas acidovorans*에서 분리한 Catechol 2,3-Dioxygenase 유전자의 염기서열 결정과 상동성 분석

이지현 · 이태호 · 임영복 · 박용근 · 김치경¹ · 민경희² · 이영록*

고려대학교 생물학과, ¹충북대 미생물학과

²숙명여대 생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

Pseudomonas acidovorans KCTC 2494 균주로부터 아닐린 분해 경로 중 *meta*-cleavage를 촉매하는 catechol 2,3-dioxygenase (C23O) 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드 pLP210의 2 kb DNA 절편을 probe로 하여 다른 catechol 분해 유전자들과 혼성화 반응을 실시한 결과 이들간에 상동성이 있음을 밝혔다. 또한 pLP210과 pLP211로부터 200 bp 정도씩 감소된 결실유도체들을 선별한 후 염기서열을 결정하였다. 이로부터 약 970 bp 정도의 open-reading frame을 발견하였으며, 323개의 아미노산을 추론하였다. 이를 기본으로 하여 다른 부류의 extradiol enzyme들과 비교하였을 때 약 70%의 상동성을 나타내었다.

KEY WORDS □ *Pseudomonas acidovorans*, catechol 2,3-dioxygenase (C23O) gene, nucleotide sequence, Southern hybridization

아닐린은 dinitroaniline계의 제초제, 염색제, 및 화학제품의 제조에 있어서 원료 또는 중간 대사 물질로 널리 이용되고 있는 방향족 화합물이다. 이러한 과정에서 환경으로 유출되는 많은 양의 아닐린은 산화, 중화, 흡착 등의 여러 복잡한 반응을 통하여 생체에 유해한 recalcitrant 분자를 형성하여 심각한 환경오염 물질이 되고 있다 (14, 19).

아닐린은 evaporation 이나 autooxidation에 의해 일부 분해되지만 대부분 미생물에 의한 생물분해를 통해 분해된다 (10, 16). 미생물에 의한 아닐린 분해의 일반적 경로는 먼저 아닐린으로부터 암모니아기가 제거되는 산화적 탈아미노화 과정으로 catechol이 형성되며 catechol은 *ortho* 대사경로나 *meta* 대사경로를 통하여 분해된다 (1, 20). 궁극적으로 난분해성 물질에 대해 분해능을 지니는 균주의 확보와 개발이 무엇보다도 중요하며 난분해성 물질의 효율적인 생물학적 과정의 개발은 우수한 산화능을 갖는 미생물을 필요로 한다. 이는 농화배양에 의해 분리한 균주에 의하거나 또는 재조합 DNA 기술에 의해 이루어질 수 있다 (8). 따라서 아닐린과 같은 난분해성 방향족 화합물을 분해하는 미생물의 물질전환 기능을 개발하여 보다 유용한 미생물을 육종하기 위해서는 이러한 물질의 분해에 대한 대사경로, 효소활성, 분해계 유전자의 유전적 정보와 발현조절 기작에 관한 연구가 필요하다 (4).

Cho 등 (1988)은 아닐린 분해능이 우수한 *P. acidovorans* KCTC2494 균주를 분리, 동정하고 그 특성을

밝힌 바 있으며 Lee 등 (1992)은 이 균주로부터 아닐린 분해경로 중 벤젠고리의 개열을 촉매하는 C23O의 유전자를 클로닝하여 특성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이 C23O 유전자의 크기를 최소화하여 다른종류의 벤젠고리 개열에 관여하는 유전자들과 hybridization에 의한 상동성을 조사하였으며 이 유전자의 염기서열을 분석하여 그 특성을 연구하였다. 이는 아닐린 분해 유전자 및 그와 관련된 분해 유전자의 구조와 발현 양상을 연구하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

본 실험에 사용한 균주와 플라스미드의 특성은 Table 1에 표시하였다. C23O 유전자는 Lee 등 (1992)이 *P. acidovorans* KCTC2494 균주로부터 클로닝한 pLP201에서 유래한 pLP205를 이용하였다.

DNA 상동성 검정

Blots의 제조시 DNA 절편을 agarose gel에서 전기영동으로 전개시킨 후 gel상의 DNA 절편을 nitrocellulose membrane으로 전이시켰으며 (25) hybridization 반응시에는 DIG-labelled DNA를 hybridization 용액으로 수행하였다. DNA probe 제조, hybridization 및 검출은 DIG-DNA labelling and detection system (Boehringer Mannheim Biochemical)의 사용지침에 따라 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study and their characteristics.

Strain/plasmids	Relevant characteristics	Reference
Strain		
<i>E. coli</i>		
XL-1-Blue	<i>SupE44 hsdR17</i> <i>recA1 endA1 thiΔ</i> <i>F1[proAB⁺ lacI^q]</i> <i>lacZΔ15 Tn10(tet^r)</i>	Stratagene Ltd.
Plasmids		
pBluescript SK +/–	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Stratagene Ltd.
pCNU103	Ap ^r , C23O	(12)
pIB1343	Ap ^r , C12O	(6)
pLP201	Ap ^r , C23O	(15)
pLP205	"	"
pLP210	"	in this study
pLP211	"	"
pLP210 (1~16) deletants	Ap ^r , pLP210 deletants	"
pLP211 (1~12) deletants	Ap ^r , pLP211 deletants	"
Phage M13K07	Km ^r	(21)

Ap^r, Km^r, and Tet^r resistance to ampicillin, kanamycin, and tetracycline, respectively. C12O, catechol 1,2-dioxygenase; C23O, catechol 2,3-dioxygenase.

C23O 유전자의 결실유도체 제조

염기서열을 결정하기 위한 결실유도체의 제조는 exonuclease III에 의한 deletion 방법 (11)으로 수행하였다. Exonuclease III는 digestion rate를 37°C에서 500 bp/min로 처리하면서 DNA 시료를 30초 간격으로 일정량씩 회수한 후 S1 nuclease를 처리하였다.

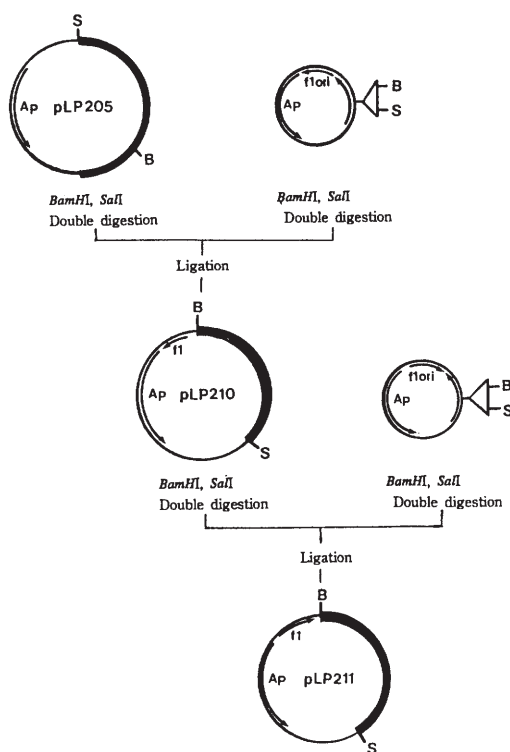
염기서열 결정

염기서열 결정은 dideoxy chain termination 방법 (22)을 이용하였으며 반응은 DNA sequenase version 2.0 kit를 사용하여 수행하였다. Primer는 17개의 뉴클레오티드로 구성된 M13 universal primer (5'-ATTAACCCCTCACTAAAG-3')와 T3 primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')를 사용했다. [α -³⁵S] dATP는 Amersham에서 구입하였으며 sequencing kit와 primer는 US Biochemical사의 제품을 사용하였다. 염기서열 결정 후 자료의 분석과 처리는 PCGENE 프로그램 (Intelligenetics)을 이용하였다.

결과 및 고찰

C23O 유전자의 subcloning

Lee 등 (1992)은 아닐린 분해균주 *Pseudomonas acidovorans* KCTC2494의 염색체 DNA로부터 catechol 2,3-dioxygenase(C23O) 유전자를 *Escherichia*

**Fig. 1.** Construction of recombinant plasmid pLP210 and pLP211.

*coli*에서 클로닝한 바 있다 (15). 본 연구에서는 이 C23O 유전자의 염기서열을 결정하기 위한 subclone을 만들기 위해 pBluescript II SK vector를 이용하였다. F1 origin을 갖고있어 helper phage M13 KO7을 감염시킬 경우 + strand를 단일가닥 DNA로 만들 수 있는 pBluescript II SK+vector에 pLP205에서 유래한 2 kb의 *Bam*HI-*Sal*II 절편을 삽입시켜 pLP210을 조립하였으며, 또한 f1 origin 방향이 SK+vector와는 반대방향이어서 - strand를 단일가닥 DNA로 만들 수 있는 pBluescript IISK-vector에 다시 subcloning하여 pLP211의 재조합 플라스미드를 조립하였다 (Fig. 1).

다른 catechol 분해 유전자들과의 상동성 조사

재조합 플라스미드 pLP210의 C23O 유전자 2 kb 절편을 probe로 하여 다른 C23O 유전자인, toluene 분해균주 *P. putida* mt-2에서 유래한 TOL plasmid의 *xyIE* 유전자가 클로닝된 pCNU103과의 hybridization을 실시하여 상동성을 조사하였다. 또한 benzoate 분해 균주에서 유래한 catechol의 *ortho* 경로 분해 유전자인 pIB1343의 catechol 1,2-dioxygenase (C12O) 유전자와 hybridization을 실시하여 이들간의 상동성도 조사하였다. 본 연구에서 클로닝한 C23O 유전자의 최초 클론, 즉 pLP201을 *Xba*I과

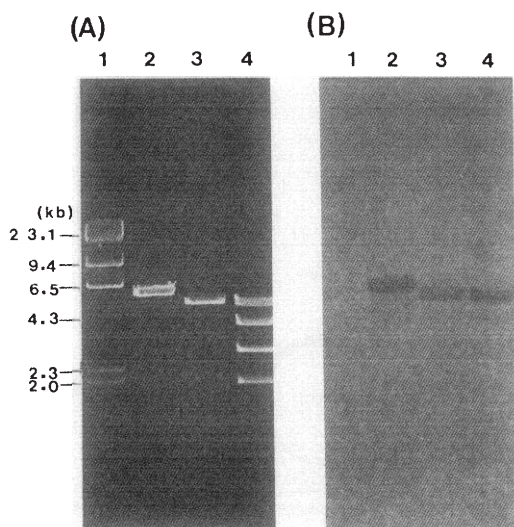


Fig. 2. Southern blot analysis of pLP210 with other catechol degradative genes.

The DNA fragments of C230 gene derived from pLP210 and other catechol dioxygenase genes were transferred to the nitrocellulose filter after digestion and gel electrophoresis.

A. Lane 1, λ DNA digested with *Hind*III; lane 2, pCNU103 digested with *Eco*RI; lane 3, pIB1343 digested with *Sal*I; lane 4, pLP201 digested with *Sal*I and *Eco*RI.

B. Hybridization patterns of respective DNAs with dioxygenin-labelled DNA.

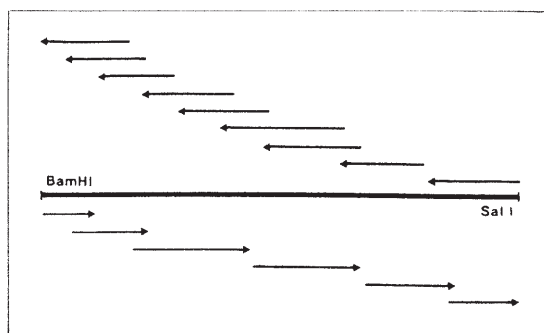


Fig. 3. Sequencing strategies of C230 gene.

Arrows represent the extent and direction of sequence analysis.

*Eco*RI로 처리하여 4개의 DNA 절편을 만든 후 이들과도 hybridization을 실시하였는데, 그 결과 pLP201을 *Xba*I과 *Eco*RI로 처리했을 때 pLP210의 C230 유전자는 4개의 DNA 절편 중 가장 큰 절편인 약 5 kb 정도되는 부분에 존재하는 것으로 나타났으며, 이 C230 유전자가 같은 extradiol 효소의 유전자인 *xyfE* 뿐만 아니라 intradiol 효소인 C120의

1	ACG GCG TGG CGC TGC TGC CCA AGT TGG TTG CCG CTG ACT ATC	42
43	CCG AAC TGG TGC CGT ACC CCG AAA AGC TCT TCT TCG AAA CGG	84
85	AGC TGT GGC TGG TCA GCC GCT TTG ACT TGC TGG CAG CTT GGC	126
127	AGC GCG AAT TGG CCG ACA GGC TGC AGG AAG AAA TGG CGA CAT	168
169	GGC CTC AAT GAC CTG GCT CCC TGT CCT GAC CAC CAG CCC GCG	210
211	CTT GCG CGC TGC CGG TCA CTA TGG CCA ACG TTG GCC TCA GCT	252
253	ATG CCT GCG CCG GCA ATG AAA GCC TGC TCA CCG GCA TGG TCC	294
295	GCC TGG GCC GCA AGG GCA TCC GGT GGG TTG CGT CAA CGG CGG	336
337	CTG CCG GGT CTG CAA GGT CCG CAT CGT CGT CGA GGG ACA	378
379	GAT CAA GCC CTG GGG CCG ATC AGC CGT GCA CAC GTG ACG CTC	420
421	GAC GAA GAG AAC CAG GGC TAA CCG TGG CAT GCC GTG GCA CCC	462
463	CAG ACG CCG TGA ACC TCG AAG TGG CCG GCA AGT TGA GCA AAC	504
505	CGT TTT CCA AGG GGC GCG CAG AGC TGC GAC TGC CAG CCC TTC	546
547	GAT TCA ACC AGC AGC AGT AAC CAC CAG GAG ACA CAA CAT GGG	588
589	ACG GTT CAG GAA CTA AGA AAG GGT GGG GAC <u>ATG</u> AAC AAG GGA	630
		<u>MET</u> Asn Lys Gly
631	GTT ATC GCG CCG GGC GAT GTG CTA GTT CGC GTA TCG GAC TAC	672
	Val Ile Ala Pro Gly Asp Val Leu Val Arg Val Ser Asp Tyr	
673	AAC AAG CCG CTA ATA CGC TAC CTG CAG TCG CAC AGC CTA CTC	714
	Asn Lys Arg Leu Ile Arg Tyr Leu Gln Ser His Ser Leu Leu	
715	TAC CTG AAG GCT TGG GTT CAA GCC CTC TTA TAC CTG ACG GCT	756
	Tyr Leu Lys Ala Trp Val Gln Ala Leu Leu Tyr Leu Thr Ala	
757	GTG TCC GAG GGG GAC GAG ACT TGC ATG ATG CTA CCG TAC CCT	798
	Val Ser Glu Gly Asp Glu Thr Cys MET MET Leu Arg Tyr Pro	
799	GAT GAG CGC GGT ACG CAT TAT ATG CGT TTC AAG CGT TTG GAA	840
	Asp Glu Arg Gly Thr His Tyr MET Arg Phe Lys Arg Leu Glu	
841	GGT GAC GCT ATA GGT TCG GCG GTT CCA TTT GTA CCG CGA TAT	882
	Gly Asp Ala Ile Gly Ser Ala Val Pro Phe Val Pro Arg Tyr	
883	GCC TGT GCG GTT GAG CAC ATA CCG GCC GGA GAA CTC AAC GGC	924
	Ala Cys Ala Val Glu His Ile Pro Ala Gly Glu Leu Asn Gly	
925	TGT CCG CGT CCG GTG CCG TTC GTC GCA CCA TCT GAA TAT TCT	966
	Cys Arg Arg Val Arg Phe Val Ala Pro Ser Glu Tyr Ser	
967	TGC AGG CTC TAC GCT AAC AGG CAG TAC GCT CCG GCA TGG CGT	1008
	Cys Arg Leu Tyr Ala Asn Arg Gln Tyr Ala Arg Ala Trp Arg	
1009	CGC GAT TAC GTG AAC CCG GAG GTT GGG CCG CCG GAA TGG AAG	1050
	Arg Asp Tyr Val Asn Pro Glu Val Gly Arg Arg Glu Trp Lys	
1051	GGT ATG GCG GCG CTG CCG ATT GAT AAC CCC CTG ACA TGT GGT	1092
	Gly MET Ala Ala Leu Arg Ile Asp Asn Pro Leu Thr Cys Gly	
1093	GAG GAA TCA CCG GGC ACT CTT GAC TGG TAT ACC GAG ATG CTC	1134
	Glu Glu Ser Pro Gly Thr Leu Asp Trp Tyr Thr Glu MET Leu	
1135	CGG TTT GAC CTG GGC GAG CAG ATC CTC GAT CAA GAC GGC ATC	1176
	Arg Phe Asp Leu Gly Glu Gln Ile Leu Asp Gln Asp Gly Ile	
1177	GGC GTC GCG CAG TTC GTC AGT CTC TCG TCC AAG GGC AAC GAT	1218
	Gly Val Ala Gln Phe Val Ser Leu Ser Ser Lys Gly Asn Asp	
1219	GTG GCT ATT ATC CAC CAC CCG GAG AAA GGC TCG CTC CAT CAC	1260
	Val Ala Ile His His Pro Glu Lys His Ser Leu His His	

Fig. 4. DNA sequence and autotranslation of the C230 gene derived from pLP210 and pLP211. A putative ribosome binding site is underlined and the amino acids deduced from the nucleotide sequence are shown in their three-letter abbreviations in second rows.

아미노산 중 완전히 일치된 경우는 41% 이었으며 비교적 상동성을 나타낸 부분은 33% 정도로 전체적으로 약 70% 정도의 아미노산 서열의 상동성을 나타내었다. *nahH*와 *xyIE* 유전자에서 추정된 아미노산 서열의 상동성 80%에 비하면 약 10% 정도 낮지만 다른 종류의 extradiol enzyme에 비해서는 상당히 높은 상동성을 나타내었다. 염기서열이나 이로부터 추정되는 아미노산 서열의 일치한 부분으로 보아 이들 C23O 유전자들이 서로 공통된 조상에서 유래한 유전자로 추측되나 이 부분에 대해서는 보다 더 연구되어야 할것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구과제의 일부로 수행되었으며, 한국과학재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Aoki, K., K. Ohtsuka, R. Shinke, and H. Nishira, 1983. Isolation of aniline assimilating bacetria and physiological characterization of aniline biodegradation in *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2569-2575.
- Bartilson, M. and V. Shinger, 1989. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-utilizing *Pseudomonas* sp. CF600. *Gene* **85**, 233-238.
- Cane, P.A. and P.A. Williams, 1986. Restriction map of naphthalene catabolic plasmid pWWO60-1 and the location of some of its catabolic genes. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2919-2929.
- Chaudhry, G.R. and S. Chapalamadugu, 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbial. Review.* **55**, 59-79.
- Cho, K.Y., I.H. Ha, K.S. Bae, and Y.H. Kho, 1988. Isolation and characterization of aniline degrading bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 421-426.
- Ellen, L.N., 1988. DNA sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 2,3-dioxygenase I structural gene cat A. *J. Bacteriol.* **170**, 4874-4880.
- Ghosal, D., I.S. You, and I.C. Gunsalus, 1987. Nucleotide sequence and expression gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xyIE* of TOL. *Gene* **55**, 19-28.
- Hallas, L.E. and M. Alexander, 1983. Microbial transformation of nitroaromatic compound in sewage effluent. *Appl. & Environ. Microbiol.* **45**, 1234-1241.
- Harayama, S. and M. Rekik, 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes and classified into two different gene families. *J. Bio. Chem.* **264**, 15328-15323.
- Heitkamp, M.A. and C.E. Cerniglia, 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an soil field. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1612-1614.
- Henikoff, S., 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 351-359.
- Kim, Y.S., B.S. Choi, K.R. Min, and C.K. Kim, 1991. Cloning of catechol 2,3-dioxygenase gene from *Pseudomonas putida*. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 155-159.
- Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi, and K. Yano, 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes evolved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS 102. *J. Bacteriol.* **171**, 2740-2747.
- Latorre, J., W. Reineke, and H.J. Knacmuss, 1984. Microbial metabolism of chloroanilines: Enhanced evolution by natural genetic exchange. *Arch. Microbiol.* **140**, 159-165.
- Lee, J.H., S.H. Bang, Y.K. Park, and Y.N. Lee, 1992. Molecular cloning and characterization of catechol 2,3-dioxygenase gene from aniline-degrading *Pseudomonas acidovorans*. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 316-321.
- Lyons, C.D., S. Katz, and R. Bartha, 1984. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 491-496.
- Nakai, C., H. Kagamiyama, and M. Nazoki, 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.* **258**, 2923-2928.
- Noda, Y., S. Nishidawa, K.I. Shiozuka, H. Kodokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasakdi, 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **172**, 2794-2709.
- Parris, G.E., 1980. Environmental and metabolic transformation of primary aromatic amines and related compounds. *Residu. Rev.* **76**, 1-30.
- Ribbons, D.W. and R.W. Eaton, 1982. Chemical transformations of aromatic hydrocarbons that support the growth of microorganisms in biodegradation and detoxification of environmental pollutants. pp. 59-84. In A.M. chakrabarty (ed.). CRC Press.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.K. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schell, M.A., 1986. Homology between nucleotide sequence of promoter regions of *nah* and *sal* operons of NAH7 plasmid of *Pseudomonas putida*.

- J. Bacteriol.* **166**, 9-14.
24. Shine, J. and L. Dalgarno, 1975. Determination of cistron specificity in bacterial ribosome. *Nature* (London) **254**, 34-38.
25. Southern, E.M., 1975. Detection of specific segments among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
26. Taira K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, and K. Furukawa, 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCP-degrading strains of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochem.* **27**, 3990-3996.
- (Received November 7, 1994)
(Accepted November 21, 1994)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence Determination and Homology Analysis of Catechol 2,3-Dioxygenase Gene Isolated from Aniline-degrading *Pseudomonas acidovorans*

Lee, J.H., T.H. Lee, Y.B. Lim, Y.K. Park, C.K. Kim¹, K.H. Min², and Y.N. Lee* (Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, ¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, ²Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, and Reserch Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Two kb DNA fragment of hybrid plasmid pLP210 which had been cloned catechol 2,3-dioxygenase (C23O) gene from *Pseudomonas acidovorans* KCTC2494 was hybridized with various catechol degrading genes and was identified the homology among the genes. The deletants were selected from hybrid plasmid pLP210 and pLP211 by exonuclease III treatment and the nucleotide sequence of C23O gene was determined from the deletants. As a result, the open-reading frame of 970 bp was discovered and 323 amino acids sequence was deduced from the data. Amino acid sequences of this 970 bp were 70% homologous with other extradiol enzymes.