

### (S3-B)

*Pseudomonas* sp. DJ77에서 Phenanthrene 생분해에 관여하는 *phn* 오페론의 구조

김영창·윤길상·박영순·신명수·김홍식·박미선·김옥현

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

오늘날 환경의 오염문제는 전 세계적으로 점차 심각성을 띠고 있다. 특히 방향족 탄화수소 (aromatic hydrocarbon)는 지방족 탄화수소 (aliphatic hydrocarbon)보다 난분해성이어서 자연계에 계속 축적되고 있다. 대표적인 방향족 탄화수소로는 phenanthrene, naphthalene, xylene, anthracene, salicylate, toluene, phthalate 등이 있으며, 특히 phenanthrene과 같은 polycyclic aromatic hydrocarbon은 돌연변이·암·기형의 원인물질로 알려져 있어 환경오염 문제가 더욱 심각하다 하겠다(Yoshimura 등, 1973; Hague 등, 1974; Safe 등, 1975; Goto 등, 1975). 이러한 난분해성 방향족 탄화수소들을 미생물이 분해해서 이용한다는 것은 최근들어 환경보건학적 측면에서 커다란 관심을 모으고 있는데 특히 미생물에 의한 생분해는 인위적으로 난분해성 물질들을 처리했을때 가져올 수도 있는 2차적 오염의 문제가 없다는 점에서 가치를 크게 인정받고 있다.

Phenanthrene을 분해하는 미생물에 대한 연구는 1928년 Tausson에 의해 처음 시작된 후 여러 학자들에 의해 진행되어 왔다(Aronson등, 1970; Alexander등, 1981; Kiyohara등, 1982; Chakrabarty등, 1985). 현재까지 밝혀진 바에 의하면 미생물에 의한 phenanthrene 분해에는 두가지 경로가 있는 것으로 알려져 있는데, 첫째는 토양의 pseudomonads에서 밝혀진 것으로 phenanthrene이 1-hydroxy-2-naphthoic acid, salicylate, catechol을 거쳐 분해되는 것이고 (Evans등, 1965), 둘째는 *Aeromonas*에서 밝혀진 분해경로(Kiyohara등, 1976)로서 phenanthrene에서 1-hydroxy-2-naphthoic acid까지 분해되는 과정까지는 토양 pseudomonads의 분해과정과 같으나 그 이후로 2-carboxybenzaldehyde, o-phthalate, protocatechuate로 분해되는 것이 다르다(Fig. 1).

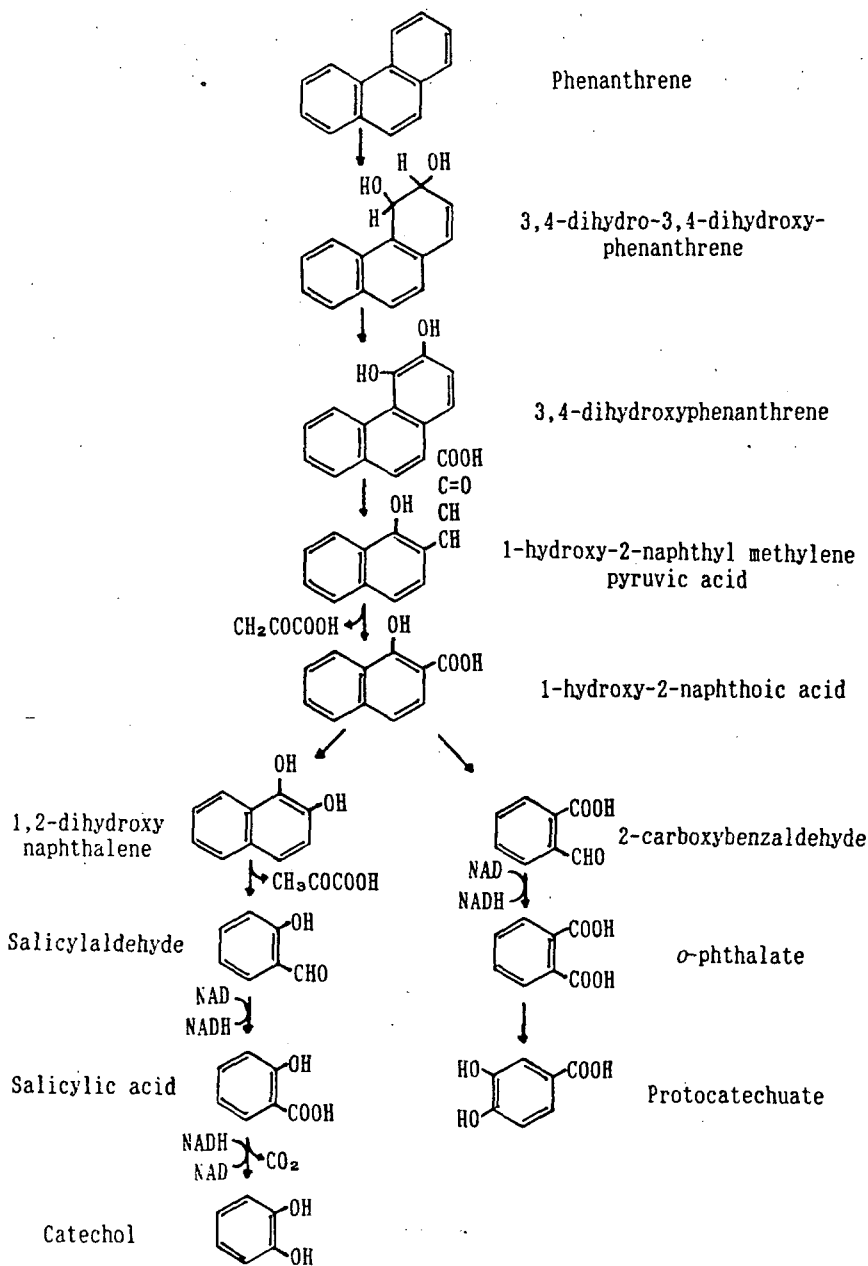


Fig. 1. The pathway of phenanthrene degradation.

Benzene이나 toluene과 같이 한 개의 benzene 고리로 구성되어 있는 물질과 naphthalene, biphenyl 등과 같이 두 개로 구성되어 있는 물질에 관해서는 많은 연구가 진행되어 왔지만 phenanthrene 등과 같이 세개의 benzene고리로 구성되어 있는 방향족 탄화수소 물질에 대해서는 연구가 비교적 일찍 시작되었지만 그 복잡성 때문에 아직 많은 진척은 이루어지고 있지 않다. Phenanthrene 대사나 효소학적인 연구는 Evans 등(1965)과 Kiyohara 와 Nago(1977) 등에 의하여 연구된바 있으나 phenanthrene 분해 유전자가 plasmid에 있다는 보고(Kiyohara 등, 1981, 1990) 외에는 분해 경로도 아직 확실하게 밝혀져 있지 않고, 분해 유전자의 구조와 발현조절에 관한 유전학적인 연구는 전혀 이루어져 있지 않다.

*Pseudomonas* sp. DJ77의 각종 탄화수소에 대한 분해능

*Pseudomonas* sp. DJ77은 phenanthrene 뿐만 아니라 biphenyl, benzoate, salicylate 등을 단일탄소원으로 이용하여 살아갈 수 있다(Kim 등, 1989). 그러나 naphthalene, anthracene, 1-hydroxy-2-naphthoate, salicylate, o-phthalate 등은 이용하지 못하였다. Phenanthrene의 중간대사 물질로 알려진 1-hydroxy-2-naphthoic acid, salicylate, o-phthalate를 단일 탄소원으로 하여 MM<sub>2</sub> 에서 5mM 농도로 첨가하여 성장여부를 조사한 결과 모두 이용하지 못하였다 (Table 1). 이들 중간대사물질이 5mM에서 DJ77에 독성을 나타내거나 이들 물질을 이용하지 못하

Table 1. Minimum inhibitory concentration of hydrocarbons on the growth of DJ77

Medium	Concentration (mM)				
	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
(MM <sub>2</sub> -50 mM Glucose)					
Benzoate	++(yy)	++(yyy)	++(yyy)	++(yy)	++(y)
Phthalate	+++	+++	+++	+++	+++
1H2NA	-	-	+	+	+
Salicylate	-	+(y)	+(yy)	++(yy)	++(y)

(+), growth. (-), no growth. (y), yellow color.  
1H2NA, 1-Hydroxy-2-naphthoic acid.

는 것으로 생각된다. Plasmid는 약 65kb와 40kb정도의 두 개를 가지고 있으며 각각의 plasmid를 순수분리하여 여러가지 제한효소로 처리한 결과 대략 4-9정도의 절편으로 절단된다. DJ77에 돌연변이를 유도하여 phenanthren<sup>+</sup> (phn<sup>+</sup>), 1-hydroxy-2-naphthoic acid<sup>-</sup> (1H2NA<sup>-</sup>), salicylate<sup>+</sup> (Sal<sup>+</sup>)와 Phn<sup>-</sup>, 1H2NA<sup>-</sup>, Sal<sup>+</sup>인 돌연변이주를 얻었다. 이상의 실험결과들은 DJ77이 phenanthrene을 salicylate를 거쳐 분해한다는 것을 의미한다.

#### Extradiol dioxygenase 유전자의 cloning과 위치결정

*Pseudomonas* sp. DJ77에서 total DNA 및 plasmids DNA 를 각각 순수분리 하여 meta-cleavage 효소 유전자의 클로닝을 하였다. Total DNA는 *Sau*3A로 부분 절단하여 약 10-20 Kb되는 절편만을 elution하여 사용하였고, plasmid는 여러가지 제한효소를 처리하여 그 양상을 비교분석한 결과 비교적 큰 절편이 생성되는 *Xho*I, *Bgl*III로 절단하여 pBLUESCRIPT vector에 ligation한 후 *E. coli* JM109 균주에 transformation하였다. Phenanthrene 분해 유전자가 일련의 operon을 구성할 것이라는 추측 하에 nutrient agar plate (0.1mg/ml indole 포함)에서 dioxygenase에 의해 파란색을 띄는 클론과, 3-methylcatechol을 분무시 extradiol dioxygenase에 의해 노란색을 띄는 클론을 선발하였다(Williams 등, 1986). Plasmids를 *Xho*I로 처리하여 X-gal 배지에서 선발한 클론 중 3-methylcatechol을 분무시 노란색을 띄는 transformant를 얻었고 이것을 분석한 결과 약 7.2Kb 정도의 *Xho*I절편이 삽입된 것을 확인하고 이를 pHENX7이라 명명하였다(Fig. 2).

pHENX7 plasmid 중에서 meta-cleavage 할 수 있는 효소 유전자의 위치를 결정하기 위하여 여러가지 결실 유도체를 제조하였다. *Pst*I 과 *Bgl*III 로 deletion 했을 때는 효소역가를 상실하였으며, *Hind*III로 절단하여 pBLUESCRIPT SK<sup>+</sup> 에 subcloning한 pHY2는 효소역가를 유지하였다. 좀더 세밀하게 위치를 파악하기 위하여 Fig.2 에서 보는바와 같이 pHY2 plasmid를 다시 *Eco*RI, *Sal*I, *Pst*I 등으로 제조한 결실 유도체의 효소역가를 측정하여 결과로부터 meta-cleavage 효소 유전자는 *Pst*I, *Eco*RI, *Sal*I 부위를 포함하는 약 1.2 Kb 절편에 위치함을 알았다.

각 subclone들의 염기배열을 결정하여 이들을 여타 탄화수소 분해 유전자들과 비교해 보고 또한 생산된 polypeptide들의 전기영동 양상과 효소역가를 측정하여 결

과 meta-cleavage compound hydrolase 유전자 (*phnD*), meta-cleavage compound dehydrogenase 유전자 (*phnG*)의 위치와 크기도 알 수 있었다(Fig. 2).

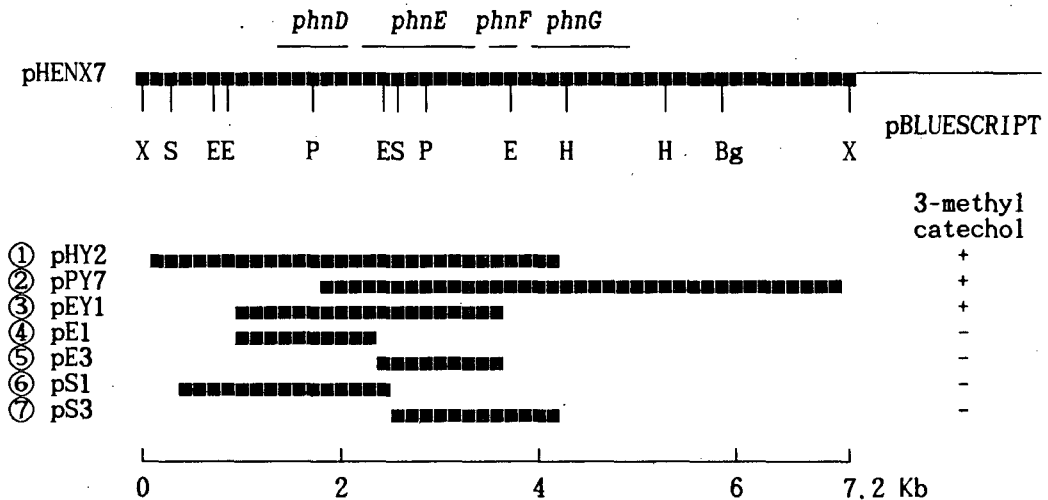


Fig. 2. Physical and genetic map of recombinant plasmid pHENX7. Abbreviations: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*III; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I; X, *Xho*I. +, yellow color; -, no color.

#### Extradiol dioxygenase 효소 유전자(*phnE*)의 염기배열과 효소의 상동성

Meta-cleavage 효소 유전자의 구조를 알아보기 위하여 pHY2 부위를 중심으로 sequencing 하였다. 이 부근에서 개시코돈의 7 bp 앞 부분에 SD sequence를 갖는 긴 ORF를 발견할 수 있었다(Fig. 3). 이 ORF가 meta-cleavage 효소 유전자 부위인지를 좀더 확인하기 위하여 염기배열로부터 유추한 효소의 아미노산 배열을 지금까지 알려진 extradiol dioxygenase들의 아미노산 배열과 비교하였다.

현재까지 열가지 extradiol enzyme의 아미노산 배열이 밝혀져 있다. *Pseudomonas putida* mt-2 에서 밝혀진 catechol 2,3-dioxygenase(XylE), pWW0와 NAH7에서 밝혀진 catechol 2,3-dioxygenase (NahH), NAH7에서 밝혀진 1,2-dihydroxy-naphthalene dioxygenase (NahC)와 *P. pseudoalcaligenes*, *P. aucimobilis*에서 밝혀진 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase (BphC)의 아미노산 배열과 매우 유사성이 있는 것으로 보고되어 있다(Hyrayana and Rekik, 1989). 따라서 이들 extradiol enzyme들은 하나의 공통된 기원에서 유래된 것으로 예상된다. 이들 extradiol enzyme들은 homogeneous한 subunit로 구성되어 있는 반면

1	ATG	CAG	CGG	GCC	GAT	CTG	CAC	CTG	TTC	GCC	GAA	TGC	GGA	CAC	TGG	GTG	48
1	Met	Gln	Arg	Ala	Asp	Leu	His	Leu	Phe	Ala	Glu	Cys	Gly	His	Trp	Val	16
49	CAG	ATC	GAG	CGG	ATG	GCA	AGT	TTC	AAC	CGG	ATG	GTT	GCC	GAG	TTC	TTT	96
17	Gln	Ile	Glu	Arg	Met	Ala	Ser	Phe	Asn	Arg	Met	Val	Ala	Glu	Phe	Phe	32
97	AAG	CAT	CTC	AAG	GCC	TGA	TCG	<u>GAG</u>	<u>AGG</u>	<u>AGA</u>	TTC	TTC	ATG	GCT	TTG	ACT	144
33	Lys	His	Leu	Lys	Ala	***							Met	Ala	Leu	Thr	48
145	GGT	GTA	ATT	CGT	CCT	GGC	TAT	GTC	CAG	CTC	AGG	GTT	CTG	GAC	TTG	GAC	192
49	Gly	Val	Ile	Arg	Pro	Gly	Tyr	Val	Gln	Leu	Arg	Val	Leu	Asp	Leu	Asp	64
193	GAG	GCC	ATT	ATC	CAC	TAC	CGC	GAC	CGG	ATT	GGT	CTA	AAC	TTC	GTC	AAT	240
65	Glu	Ala	Ile	Ile	His	Tyr	Arg	Asp	Arg	Ile	Gly	Leu	Asn	Phe	Val	Asn	80
241	CGC	GAG	GGG	GAT	CGG	GCC	TTT	TTC	CAG	GCG	TTC	GAC	GAA	TTC	GAT	CGT	288
81	Arg	Glu	Gly	Asp	Arg	Ala	Phe	Phe	Gln	Ala	Phe	Asp	Glu	Phe	Asp	Arg	96
289	CAC	AGT	ATC	ATC	CTT	CGC	GAG	GCC	GAT	CAG	GCG	GGC	ATG	GAT	GTG	ATG	336
97	His	Ser	Ile	Ile	Leu	Arg	Glu	Ala	Asp	Gln	Ala	Gly	Met	Asp	Val	Met	112
337	GGC	TTC	AAG	GTC	GCC	AAG	GAC	GCG	GAC	TTG	GAC	CAT	TTT	ACC	CGA	GCG	384
113	Gly	Phe	Lys	Val	Ala	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu	Asp	His	Phe	Thr	Arg	Ala	128
385	CTT	GCG	CGA	TAT	CGG	TGT	CCA	TGT	CGA	CGT	GAT	CCC	GGC	GGG	GAA	GAT	432
129	Leu	Ala	Arg	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys	Arg	Arg	Asp	Pro	Gly	Gly	Glu	Asp	144
433	CCC	GGT	GTA	GGC	CGC	AAG	ATT	CGG	TTT	AAC	ACG	CCG	ACA	CAG	CAC	GTC	480
145	Pro	Gly	Val	Gly	Arg	Lys	Ile	Arg	Phe	Asn	Thr	Pro	Thr	Gln	His	Val	160
481	TTC	GAA	CTT	TAC	GCC	GAG	ATG	GCT	GTC	GGC	CAC	CGG	TCC	GGC	CGT	CAA	528
161	Phe	Glu	Leu	Tyr	Ala	Glu	Met	Ala	Val	Gly	His	Arg	Ser	Gly	Arg	Gln	176
529	GAA	CCC	CGA	TGT	CTG	GGT	CGT	GGA	GCC	ACG	TGG	ATG	CGT	GCC	ACC	CGC	576
177	Glu	Pro	Arg	Cys	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	Trp	Met	Arg	Ala	Thr	Arg	192
577	TTT	GAT	CAC	TGT	GCG	CTC	AAC	GGC	GTG	GAT	ATA	GCC	AGT	TCG	GCC	AAG	624
193	Phe	Asp	His	Cys	Ala	Leu	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	208
625	ATT	TTT	GTC	GAT	GCG	CTT	GAT	TTC	TCA	GTC	GCC	GAG	GAA	CTG	GTC	GAT	672
209	Ile	Phe	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	Phe	Ser	Val	Ala	Glu	Glu	Leu	Val	Asp	224
673	GAA	ACC	AGC	GGC	GCC	CGG	CTC	GGC	ATC	TTT	CTT	AGC	TGC	AGC	AAC	AAA	720
225	Glu	Thr	Ser	Gly	Ala	Arg	Leu	Gly	Ile	Phe	Leu	Ser	Cys	Ser	Asn	Lys	240
721	GCA	CAC	GAT	GTC	GCC	TTC	TTA	GGC	TAT	CCC	GAA	GAC	GGT	AAG	ATC	CAC	768
241	Ala	His	Asp	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Tyr	Pro	Glu	Asp	Gly	Lys	Ile	His	256
769	CAT																771
257	His																257

Fig. 3. Nucleotide sequence of the *phnDE* gene. A putative ribosome binding site is underlined, and the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is also presented.

protocatechuate 4,5-dioxygenase는 heterogeneous한  $\alpha$ (17KD),  $\beta$ (33.8) 두개의 subunits로 구성되어 있으며 이들과 전혀 상동성이 없다. 한편 intradiol enzyme 인 catechol 1,2-dioxygenase(TfdC), protocatechuate 3,4-dioxygenase 등과도 아

PhnE	M	A	L	T	-	G	V	I	R	P	G	Y	V	Q	L	R	V	L	D	L	D	E	A	I	I	H	Y	R	D	R
NahH	M	N	K	-	-	G	V	M	R	P	G	H	V	Q	L	R	V	L	D	M	G	K	A	L	E	H	Y	V	E	L
XylE	M	N	K	-	-	G	V	M	R	P	G	H	V	Q	L	R	V	L	D	M	S	K	A	L	E	H	Y	V	E	L
DmpB	M	N	K	-	-	G	V	M	R	P	G	H	V	Q	L	R	V	L	N	L	E	S	A	L	A	H	Y	R	D	L
NahC	M	S	K	Q	A	A	V	I	E	L	G	Y	M	G	I	S	V	K	D	P	D	A	W	K	S	F	A	M	N	M
BphC-Q	M	-	-	-	V	A	V	T	E	L	G	Y	L	G	L	T	V	T	N	L	D	A	W	R	S	Y	A	A	E	V
BphC-K	M	S	-	-	-	I	E	R	L	G	Y	L	G	F	A	V	K	D	V	P	A	W	D	H	F	L	T	K	S	
BphC-F	M	S	-	-	-	I	R	S	L	G	Y	M	G	F	A	V	S	D	V	A	A	W	R	S	F	L	T	Q	K	
TodE	M	S	-	-	-	I	Q	R	L	G	Y	L	G	F	E	V	A	D	V	R	S	W	R	T	F	A	T	T	R	

1 10 20 30

PhnE	I	G	L	N	F	V	N	R	-	E	G	D	R	A	F	F	Q	A	F	D	E	F	D	R	H	S	I	I	L	R		
NahH	L	G	L	I	E	M	D	R	D	D	Q	G	R	V	Y	L	K	A	W	T	E	V	D	K	F	S	V	V	L	R		
XylE	L	G	L	I	E	M	D	R	D	D	Q	G	R	V	Y	L	K	A	W	T	E	V	D	K	F	S	L	V	L	R		
DmpB	L	G	L	I	E	M	D	R	D	D	Q	G	R	V	Y	L	K	A	W	T	E	V	D	K	F	S	V	V	L	R		
NahC	L	G	L	Q	V	L	D	E	G	E	K	D	R	F	Y	L	R	M	D	Y	W	H	H	R	I	V	H	H	S			
BphC-Q	A	G	M	E	I	V	D	E	G	E	G	D	R	L	Y	L	R	M	D	Q	W	H	H	R	I	V	L	H	A	S		
BphC-K	V	G	L	M	A	A	G	S	A	-	G	D	A	A	L	Y	R	I	A	D	I	Q	R	A	W	R	I	A	V	Q	P	G
BphC-F	L	G	L	M	E	A	G	T	T	D	N	G	D	-	L	F	R	I	D	S	R	A	W	R	I	A	V	Q	Q	G		
TodE	L	G	M	M	E	A	-	S	A	S	E	T	E	A	T	F	R	I	D	S	R	A	W	R	L	S	V	S	R	G		

31 40 50 60

PhnE	E	A	D	Q	I	A	G	M	D	V	M	G	F	K	V	I	A	K	D	A	D	L	D	H	F	T	R	A	L	A	R	Y	
NahH	E	A	D	E	P	G	M	D	F	M	G	F	K	V	V	D	E	D	S	L	N	R	L	T	D	D	L	N	F				
XylE	E	A	D	E	P	G	M	D	F	M	G	F	K	V	V	D	E	D	A	L	R	Q	L	E	R	D	L	M	A	Y			
DmpB	E	A	D	Q	I	P	G	M	D	F	M	G	F	K	V	T	D	E	D	C	L	N	R	L	T	Q	D	L	L	N	Y		
NahC	A	E	D	D	-	L	E	Y	L	-	G	W	R	V	A	G	K	P	E	F	E	A	L	G	Q	K	L	I	D	A			
BphC-Q	D	S	D	D	-	L	A	Y	L	-	G	W	R	V	A	D	P	V	E	F	D	A	M	V	A	K	L	T	A	A			
BphC-K	E	L	D	D	-	L	A	Y	-	A	G	L	E	V	D	D	A	A	A	L	E	R	M	A	D	K	L	R	Q	A			
BphC-F	E	V	D	D	-	L	A	-	F	A	G	Y	E	V	A	D	A	A	G	L	A	Q	M	A	D	K	L	K	Q	A			
TodE	P	A	D	D	Y	L	-	-	F	A	G	F	E	V	D	S	E	Q	G	L	Q	E	V	K	E	S	L	Q	A	H			

61 70 80 90

PhnE	R	C	P	C	R	R	D	P	G	G	E	D	P	G	V	G	R	K	I	R	F	N	T	-	-	-	P	T	Q	H
NahH	G	C	L	I	E	N	V	A	A	G	E	L	K	G	C	G	R	R	V	R	F	Q	A	-	-	-	P	S	G	H
XylE	G	C	A	V	E	Q	L	P	A	G	E	L	N	S	C	G	R	R	V	R	F	Q	A	-	-	-	P	S	G	H
DmpB	G	C	L	L	E	T	I	P	A	G	E	L	K	G	C	G	R	R	V	R	F	Q	T	-	-	-	P	S	G	H
NahC	G	Y	K	I	R	-	V	C	D	K	V	E	A	Q	E	R	M	V	L	G	L	M	K	T	E	D	P	G	G	N
BphC-Q	G	-	I	S	L	T	V	A	S	E	A	E	A	R	E	R	R	V	L	G	L	A	K	L	A	D	P	G	G	N
BphC-K	G	V	A	F	T	R	G	D	E	A	-	L	M	Q	Q	R	K	V	M	G	L	L	C	L	Q	D	P	F	G	L
BphC-F	G	I	A	V	T	T	G	D	-	A	S	L	A	R	R	R	G	V	T	G	L	I	T	F	A	D	P	F	G	L
TodE	G	V	T	V	K	V	E	G	G	E	-	L	I	A	K	R	G	V	L	G	L	I	S	C	T	D	P	F	G	N

91 100 110 120

PhnE	V	F	E	L	Y	A	E	M	A	V	-	G	H	-	R	S	G	R	O	E	P	R	C	L	G	R	G	A	T	W
NahH	V	F	E	L	Y	A	D	K	E	Y	T	G	K	W	G	V	S	E	V	N	P	E	A	W	P	R	D	L	K	G
XylE	V	F	E	L	Y	A	D	K	E	Y	T	G	K	W	G	L	N	D	V	N	P	E	A	W	P	R	D	L	K	G
DmpB	F	F	E	L	Y	A	D	K	E	Y	T	G	K	W	G	L	E	E	T	N	P	E	A	W	P	R	N	L	K	G
NahC	P	T	E	I	F	W	G	P	R	I	D	M	S	-	-	-	N	P	F	H	P	G	R	P	L	H	G	K	F	V
BphC-Q	P	T	E	I	F	Y	G	P	Q	V	D	T	H	-	-	-	K	P	F	H	P	G	R	P	M	Y	G	K	F	V
BphC-K	P	L	E	I	Y	Y	G	P	A	E	I	F	H	-	-	-	E	P	F	L	P	S	A	P	V	S	G	-	F	V
BphC-F	P	L	E	I	Y	Y	G	A	S	E	V	F	E	-	-	-	K	P	F	L	P	G	A	A	V	S	G	-	F	L
TodE	R	V	E	I	Y	Y	G	A	T	E	L	F	E	-	-	-	R	P	F	A	S	P	T	G	V	S	G	-	F	Q

121 130 140 150

PhnE	M	R	A	-	R	F	D	H	C	I	A	L	N	-	G	V	P	I	A	S	S	A	K	I	F	-	V	D	A	L	D	
NahH	M	A	A	V	R	F	D	H	C	L	L	Y	-	G	D	E	L	Q	A	T	Y	E	L	F	-	T	E	V	L	G		
XylE	M	A	A	V	R	F	D	H	A	L	M	Y	-	G	D	E	L	P	A	T	Y	D	L	F	-	T	K	V	L	G		
DmpB	M	R	A	V	R	F	D	H	C	L	L	Y	-	G	D	E	L	Q	A	T	Y	D	L	F	-	T	E	V	L	G		
NahC	T	G	D	Q	G	L	G	H	C	I	V	R	Q	T	D	V	A	A	A	H	K	-	-	F	Y	-	S	L	L	G		
BphC-Q	T	G	S	E	G	I	G	H	C	I	L	R	Q	D	D	V	P	A	A	A	A	-	-	F	Y	-	G	L	L	G		
BphC-K	T	G	D	Q	G	L	G	H	F	V	R	C	V	P	D	T	A	K	A	M	A	-	-	F	Y	T	E	V	L	G		
BphC-F	T	G	E	Q	G	L	G	H	F	V	R	C	V	P	D	S	D	K	A	L	A	-	-	F	Y	T	D	V	L	G		
TodE	T	G	D	Q	G	L	G	H	Y	V	L	S	V	A	D	V	D	A	A	L	A	-	-	F	Y	T	K	A	L	G		
	151					160									170																180	
PhnE	F	I	S	-	V	A	E	E	L	V	D	E	T	S	G	-	A	R	L	G	I	-	-	F	L	S	C	S	N	K	A	
NahH	F	Y	-	L	A	E	Q	-	V	V	D	A	D	G	-	I	R	L	A	Q	-	-	F	L	S	L	S	T	K	A		
XylE	F	Y	-	L	A	E	Q	-	V	L	D	E	N	G	-	T	R	V	A	Q	-	-	F	L	S	L	S	T	K	A		
DmpB	F	Y	-	L	A	E	Q	-	V	I	D	D	D	G	-	T	R	V	A	Q	-	-	F	L	S	L	S	T	K	A		
NahC	F	R	G	D	V	E	Y	R	I	P	L	P	N	G	M	T	-	-	A	E	L	S	F	M	H	C	N	A	R	D		
BphC-Q	L	R	G	S	V	E	Y	H	L	Q	L	P	N	G	M	-	-	V	A	Q	P	H	F	M	H	C	N	A	R	Q		
BphC-K	F	I	V	-	L	S	D	I	I	D	I	Q	M	G	P	E	T	S	V	P	I	A	H	-	F	L	H	C	N	G	R	H
BphC-F	F	Q	-	L	S	D	V	I	D	M	K	M	G	P	D	V	T	V	P	I	V	-	Y	F	L	D	C	N	E	R	H	
TodE	F	Q	-	L	A	D	V	I	D	W	T	T	G	-	D	G	L	S	V	T	L	Y	F	L	Y	C	N	G	R	H		
	181					190									200																210	
PhnE	H	D	V	A	F	L	G	Y	P	E	D	G	K	I	H	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NahH	H	D	V	A	F	I	H	H	A	E	K	G	K	F	H	H	A	S	F	F	L	D	T	W	E	D	V	L	R	A		
XylE	H	D	V	A	F	I	H	H	P	E	K	G	R	L	H	H	V	S	F	H	L	E	T	W	E	D	V	L	R	A		
DmpB	H	D	V	A	F	I	H	C	P	E	K	G	K	F	H	H	V	S	F	F	L	E	T	W	E	D	V	L	R	A		
NahC	H	S	I	A	F	G	A	M	P	I	A	A	K	R	L	N	H	L	M	L	E	Y	T	H	M	E	D	L	G	Y	T	
BphC-Q	H	S	V	A	F	G	L	G	P	M	E	K	R	I	N	H	L	M	F	E	Y	T	D	L	D	D	L	G	L	A		
BphC-K	H	T	I	A	L	A	A	F	P	I	P	K	R	I	H	H	F	M	L	O	A	N	T	I	D	D	V	G	Y	-		
BphC-F	H	T	L	A	I	A	A	F	P	L	P	K	R	I	H	H	F	M	L	E	V	A	S	P	D	D	V	G	F	A		
TodE	H	S	F	A	F	A	K	L	P	G	S	K	R	L	H	H	F	M	L	O	A	N	G	M	D	D	V	G	L	A		
	211					220									230																240	
NahH	A	D	L	I	S	M	T	D	T	S	I	D	I	G	P	T	R	H	G	L	T	Q	G	K	T	I	Y	F	F	D		
XylE	A	D	L	I	S	M	T	D	T	S	I	D	I	G	P	T	R	H	G	L	T	H	G	K	T	I	Y	F	F	D		
DmpB	A	D	L	I	S	M	T	D	T	S	I	D	I	G	P	T	R	H	G	L	T	H	G	K	T	I	Y	F	F	D		
NahC	H	Q	Q	F	V	K	N	E	I	D	I	A	L	Q	L	G	I	H	A	N	D	K	A	L	T	F	Y	G	A	T		
BphC-Q	H	D	I	V	R	A	R	K	I	D	V	A	L	Q	L	G	K	H	A	N	D	Q	A	L	T	F	Y	C	A	N		
BphC-K	-	-	-	-	-	R	V	G	R	I	T	S	L	L	G	R	H	T	N	D	Q	T	L	S	F	Y	A	D	T			
BphC-F	F	D	K	F	D	A	D	-	G	L	I	T	S	T	L	G	R	H	T	N	D	H	M	V	S	F	Y	A	S	T		
TodE	Y	D	-	-	D	A	E	R	A	V	V	M	S	-	L	G	R	H	T	N	D	H	M	I	S	F	Y	G	A	T		
	241					250									260																270	
NahH	P	S	G	N	R	-	C	E	V	F	C	G	G	N	Y	N	Y	P	D	H	K	P	V	T	W	L	A	K	D	V		
XylE	P	S	G	N	R	-	N	E	V	F	C	G	G	D	Y	N	Y	P	D	H	K	P	V	T	W	T	T	D	Q	L		
DmpB	P	S	G	N	R	-	N	E	V	F	C	G	G	D	Y	N	Y	Q	D	H	K	P	V	T	W	L	A	K	D	L		
NahC	P	S	G	W	L	-	I	E	P	G	W	R	G	A	-	T	A	I	D	E	A	E	Y	Y	-	-	V	-	-	-		
BphC-Q	P	S	G	W	L	-	W	E	F	G	W	-	G	A	R	K	A	P	S	Q	Q	E	Y	Y	-	T	-	-	-	-		
BphC-K	P	S	P	M	I	-	E	V	E	F	G	W	-	G	P	R	T	V	D	S	S	-	-	-	-	W	T	V	A	R	H	
BphC-F	P	S	G	V	-	E	V	E	Y	G	W	S	-	A	R	T	V	D	R	S	-	-	-	-	W	V	V	V	R	H		
TodE	P	S	G	F	A	-	V	E	Y	G	W	-	G	A	R	E	V	T	R	H	-	-	-	-	W	S	V	V	R	H		
	271					280									290																300	



NahH	GK	-	A	I	F	Y	H	D	R	V	L	N	E	R	F	M	T	V	M	T		
XylE	GK	-	A	I	F	Y	H	D	R	I	L	N	E	R	F	M	T	V	L	T		
DmpB	GK	-	A	I	F	Y	H	D	R	V	L	N	E	R	F	L	T	V	L	T		
NahC	GD	-	-	I	F	G	H	G	V	E	A	P	G	Y	G	L	D	V	K	L	S	
BphC-Q	RD	-	-	I	F	G	H	G	N	E	A	A	G	Y	G	M	D	I	P	L	G	
BphC-K	S	R	T	A	M	W	G	H	K	S	V	R	G	-	-	-	-	-	-	Q	R	
BphC	D	S	P	S	M	W	G	H	K	S	V	R	D	K	A	L	R	A	T	K	H	E
TodE	D	R	I	S	I	W	G	H	K	F	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	Q	P	E
	301									310										320		326

Fig. 4. Homologous region of the *phnE* gene product and other meta-cleavage enzymes. Asterisks indicate conserved amino acid in all meta-cleavage enzymes found so far. NahH, catechol-2,3-dioxygenase encoded by the NAH7 plasmid(Ghosal et al, 1987); XylE, catechol-2,3-dioxygenase encoded by the TOL plasmid(Nakai et al, 1983); NahC, 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase encoded by the NAH7 plasmid(Harayama and Rekik, 1989); DmpB, catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* CF600 (Bartilson and Shingler, 1989); BphC-Q, 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas paucimobilis* Q<sub>1</sub> (Taira et al, 1988); BphC-K, 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain KKS 102(Kimbara et al, 1989); BphC-F, 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(Furukawa et al, 1987); TodE, 3-methylcatechol dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1(Zylstra and Gibson, 1989).

PhnG		V	H	E	A	S	Q	A	E	L	A	D	A	V	Q	A	A	L	T	A	V	-	-	-	-	
DmpC	V	I	A	R	V	H	E	A	G	R	A	E	V	D	A	A	V	Q	A	A	R	A	A	-	L	K
ALDH-C	v	i	c	q	v	a	e	g	d	k	e	d	v	d	k	a	v	k	a	a	r	a	a	q	l	g
ALDH-A	V	I	T	S	V	H	E	A	T	E	K	D	V	D	V	A	V	A	A	A	R	A	A	-	E	G
	31								40											50					60	
PhnG	G	K	M	T	T	A	E	R	-	V	K	L	I	T	V	A	T	E	I	E	R	R	A	D	D	F
DmpC	G	K	M	S	V	S	E	R	A	E	L	L	H	R	V	A	D	G	I	T	A	R	F	D	E	F
ALDH-C	R	R	M	D	A	S	e	r	G	R	L	L	N	R	L	A	D	-	L	i	E	R	D	R	T	
ALDH-A	R	Q	V	T	P	S	E	R	G	I	L	T	N	K	L	A	D	-	L	M	E	R	D	I	D	
	61								70											80					90	
PhnG	E	V	A	T	-	-	-	-	V	M	S	S	H	I	D	I	P	R	G	A	A	N	F	R	M	
DmpC	E	C	L	D	T	G	K	P	K	S	L	A	S	H	I	D	I	P	R	G	A	A	N	F	K	
ALDH-C	E	T	L	D	N	G	K	P	y	V	I	S	Y	L	v	D	L	d	M	V	I	K	C	L		
ALDH-A	E	S	L	D	N	G	K	A	F	T	M	A	-	K	V	D	L	A	N	S	I	G	C	L		
	91								100											110				120		
PhnG	V	S	T	M	P	G	E	S																		
DmpC	L	K	N	V	A	T	E	A	F	E	M	A	T	P	D	G	S	G	A	I	N	Y	A	V		
ALDH-C	-	-	-	-	A	D	K	Y	H	G	K	T	I	P	i	D	G	D	F	F	S	Y	T	R		
ALDH-A	-	-	-	-	A	D	K	I	H	G	Q	T	I	D	T	N	P	E	T	L	T	Y	T	R		
	121								130											140				150		

Fig. 5. Amino acid sequence comparison of PhnG with aldehyde dehydrogenases from various sources. DmpC, 2-hydroxyruconic semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas* CF600 (Nordlund and Shingler, 1990). ALDH-C, a consensus sequence of horse and human, cytosolic and mitochondrial dehydrogenases. Lower case letters indicate where the residue is present in two or three of the four sequences, and o indicates the position where no common residue was found. ALDH-A, aldehyde dehydrogenase from *A. nidulans*.

미노산 배열의 유사성이 발견되지 않고있다(Noda 등, 1990). 기존에 밝혀진 extradiol dioxygenase들은 아미노산 배열의 상동성에 의거 크게 세부류로 나눌 수 있는데(Fig. 4), 1군에는 NahH, XylE와 DmpB, 2군에는 NahC와 Bph-Q, 3군에는 BphC-F, BphC-K TodE가 속한다. 본 연구에서 cloning한 PhnE 효소는 아미노산 배열 분석 결과 첫 번째 그룹에 속하지만 상동성에 있어서는 33%로 비교적 낮았다.

*Pseudomonas* sp. DJ77은 phenanthrene 뿐만 아니라 biphenyl, benzoate, salicylate 등을 이용하여 살아갈 수 있다. 이 균주의 phenanthrene 분해경로는 3,4-dihydroxyphenanthrene, 1-hydroxy-2-naphthoic acid 를 거쳐서 salicylic acid, catechol로 분해되는 것으로 추측된다(Kim 등, 1989). 따라서 이들 중간 대사물질을 meta-cleavage 할 수 있는 효소는 3,4-dihydroxyphenanthrene dioxygenase, 1,2-dihydroxynaphthlane dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase, 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase 등이 존재한다고 생각된다. *phnE*에 암호화된 extradiol dioxygenase는 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl 등을 meta-cleavage 할 수 있다. 따라서 기존에 밝혀지지 않은 3,4-dihydroxyphenanthren dioxygenase일 가능성도 있다고 하겠다.

#### Meta-cleavage compound hydrolase 유전자의 염기배열

Phenanthrene 분해유전자가 operon을 구성하리라는 추정하에 meta-cleavage 효소 유전자 옆부위의 DNA sequence를 결정한 결과 하나의 ORF가 나타났다(*phnD*). *PhnD*는 Fig. 3, 6와 8에 나타낸 것과 같이 *BphD*, *Tod C1C2BADE* operon의 앞 부분에서 발견되는 ORF(*TodX1*이라고 명명)와 아미노산 배열의 상동성이 높았다. 이 결과는 이 유전자와 *todX1*이 meta-cleavage compound hydrolase 유전자임을 시사하며 phenanthrene 분해 유전자들이 일련의 operon을 구성하고 있음을 의미한다.

#### Meta-cleavage compound dehydrogenase 유전자의 염기배열

*PhnG*는 Fig. 5과 7에 나타낸 것과 같이 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase와 기타 aldehyde dehydrogenase들의 아미노산 배열과 상동성이 높았다. 이 결과는 이 유전자가 meta-cleavage compound dehydrogenase 유전자임을 시사한다.

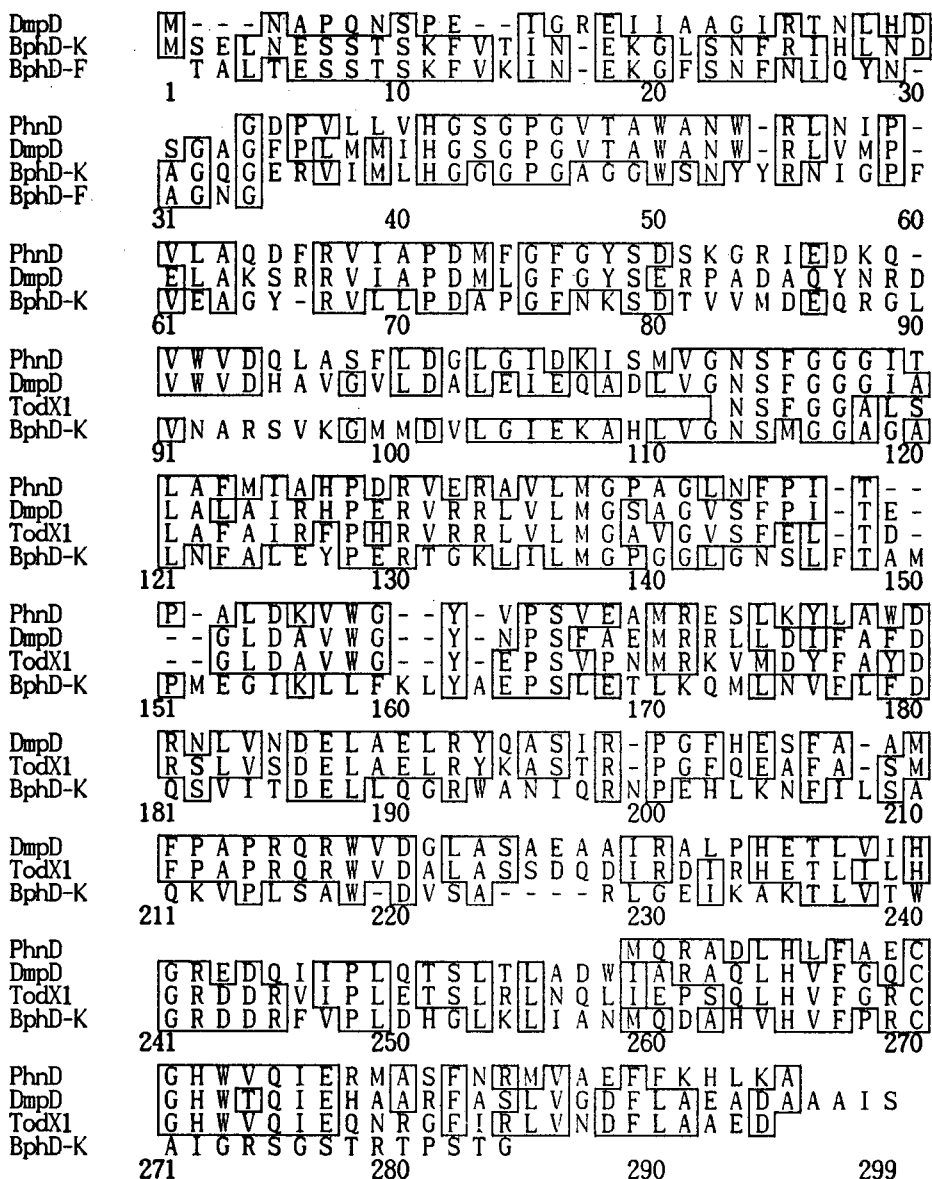


Fig. 8. Homologous region of the *phnD* gene product and other meta-cleavage compound hydrolases. Identical residues are boxed. DmpD, 2-hydroxy-muconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600 (Nordlund and Shingler, 1990); TodX1, Unknown ORF found upstream of the *tod* operon from *Pseudomonas putida* Fl(Zylstra and Gibson, 1989); BphD-K, 2-hydroxy-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain KKS 102(Kimbara et al, 1989)

1	GGC	GAT	CCG	GTC	CTG	TTG	GTT	CAT	GGT	TCC	GGG	CCT	GGC	GTG	ACT	GCA	48
1	Gly	Asp	Pro	Val	Leu	Leu	Val	His	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	16
49	TGG	GCC	AAC	TGG	CGC	CTG	AAC	ATT	CCG	GTT	CTT	GCT	CAG	GAT	TTC	CGG	96
17	Trp	Ala	Asn	Trp	Arg	Leu	Asn	Ile	Pro	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Arg	32
97	GTC	ATC	GCG	CCC	GAC	ATG	TTC	GGT	TTC	GGC	TAT	TCG	GAC	AGC	AAG	GGC	144
33	Val	Ile	Ala	Pro	Asp	Met	Phe	Gly	Phe	Gly	Tyr	Ser	Asp	Ser	Lys	Gly	48
145	CGG	ATC	GAA	GAC	AAG	CAG	GTC	TGG	GTC	GAT	CAG	CTC	GCC	AGT	TTT	CTC	192
49	Arg	Ile	Glu	Asp	Lys	Gln	Val	Trp	Val	Asp	Gln	Leu	Ala	Ser	Phe	Leu	64
193	GAC	GGA	TTG	GGC	ATC	GAC	AAG	ATT	TCG	ATG	GTC	GGC	AAC	TCG	TTC	GGT	240
65	Asp	Gly	Leu	Gly	Ile	Asp	Lys	Ile	Ser	Met	Val	Gly	Asn	Ser	Phe	Gly	80
241	GGC	GGG	ATC	ACG	CTG	GCA	TTC	ATG	ATT	GCC	CAC	CCC	GAT	CGG	GTG	GAA	288
81	Gly	Gly	Ile	Thr	Leu	Ala	Phe	Met	Ile	Ala	His	Pro	Asp	Arg	Val	Glu	96
289	CGC	GCC	GTT	CTG	ATG	GGG	CCT	GCA	GGG	CTC	AAC	TTT	CCG	ATT	ACT	CCT	336
97	Arg	Ala	Val	Leu	Met	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Asn	Phe	Pro	Ile	Thr	Pro	112
337	GCG	CTC	GAC	AAG	GTT	TGG	GGC	TAC	GTG	CCG	TCA	GTT	GAG	GCC	ATG	CGC	384
113	Ala	Leu	Asp	Lys	Val	Trp	Gly	Tyr	Val	Pro	Ser	Val	Glu	Ala	Met	Arg	128
385	GAA	TCG	CTC	AAG	TAC	CTT	GCC	TGG	GAT								411
129	Glu	Ser	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Trp	Asp								137

Fig. 6. Nucleotide sequence of the *phnD*. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is also shown.

1	GTG	CAC	GAA	GCA	AGC	CAG	GCA	GAG	CTC	GCC	GAC	GCC	GTT	CAA	GCC	GCG	48
1	Val	His	Glu	Ala	Ser	Gln	Ala	Glu	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	16
49	CTT	ACC	GCG	GTG	GGC	AAG	ATG	ACC	ACG	GCC	GAA	CGG	GTC	AAG	CTG	ATC	96
17	Leu	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Met	Thr	Thr	Ala	Glu	Arg	Val	Lys	Leu	Ile	32
97	ACC	GTG	GCG	ACC	GAG	ATC	GAA	CGC	CGA	GCG	GAT	GAT	TTC	CTG	GCT	GCC	144
33	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Ile	Glu	Arg	Arg	Ala	Asp	Asp	Phe	Leu	Ala	Ala	48
145	GAA	GTG	GCG	ACA	GCA	AGC	CGC	GTC	ATG	TCG	TCG	CAT	ATC	GAT	ATT	CCG	192
49	Glu	Val	Ala	Thr	Ala	Ser	Arg	Val	Met	Ser	Ser	His	Ile	Asp	Ile	Pro	64
193	CGC	GGA	GCC	GCT	AAC	TTC	CGC	ATG	TTC	GCC	GAT	GTC	GTC	TCG	ACG	ATG	240
65	Arg	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Arg	Met	Phe	Ala	Asp	Val	Val	Ser	Thr	Met	80
241	CCG	GGC	GAA	AGC													252
81	Pro	Gly	Glu	Ser													84

Fig. 7. Nucleotide sequence of the *phnG* gene. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is also presented.

## 결 론

1. *Pseudomonas* sp. DJ77 은 phenanthrene 뿐만 아니라 biphenyl, benzoate, salicylate 등을 이용하여 살아갈 수 있다. Plasmid는 약 65kb와 40kb정도의 두 개를 가지고 있는데 이 plasmid는 phenanthrene 분해에 관련된 효소 유전자를 갖고 있다.

2. Meta-cleavage 효소 유전자(*phnE*), meta-cleavage compound hydrolase 유전자(*phnD*), *phnF* 유전자와 meta-cleavage compound dehydrogenase 유전자(*phnG*)는 *XhoI*-7.2 Kb 절편상에 위치하며 하나의 *phnDEFG* operon으로 구성되어 있다.

3. 효소의 아미노산 배열은 다른 유사기능을 갖는 효소와 상동성을 보인다. 그러나 그 정도가 낮아 새로운 형태의 효소로 생각된다. PhnE는 extradiol dioxygenase의 3부류중 1군의 효소들과 비교적 높은(33 %) 상동성을 보인다. PhnD는 BphD, TodX<sub>1</sub>과 아미노산 배열의 상동성이 높았다. 이 결과는 이 유전자와 *todX1*이 meta-cleavage compound hydrolase 유전자임을 시사한다.

4. *phnE*에 암호화된 extradiol dioxygenase는 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl 등을 meta-cleavage 할 수 있다.

사 사. 본 연구는 1988년도 및 1990년도 문교부의 유전공학연구를 위한 학술연구조성비와 분자미생물학 연구센터의 연구비지원에 의하여 이루어졌음.

## 참 고 문 헌

1. Aronson, S. 1970. Experimental microbial ecology. pp.91-92. Academic press, Inc. New York.
2. Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. Science. 211:132-138.
3. Barnsley, B.A., K. M. Shamsuzzaman. 1974. The regulation of naphthalene metabolism in pseudomonads. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:582-589.
4. Chakrabarty, A. M., D. Ghosal, I. S. You, and D. K. Chatterjee. 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. Science. 228:135-142.
5. Dagley, S., P. J. Geary, and J. M. Wood. 1968. The metabolism of protocatechuate by *Pseudomonas testosteroni*. Biochem. J. 109:559-568.
6. Evans, W. C., H. N. Fernley, and E. Griffiths. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonas*: the

- ring-fission metabolism. *Biochem. J.* 85:819-831.
7. Frantz, B., and A. M. Chakrabarty. 1987. Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorocatechol degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4460-4464.
  8. Furukawa, K., J. R. Simon, and A. M. Chakrabarty. 1983. Common induction and regulation of biphenyl, xylene/toluene, and catabolism in *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 154:1356-1362.
  9. Furukawa, K., N. Arimura, and T. Miyazaki. 1987. Nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 169:427-429.
  10. Furukawa, K., K. Taira, N. Hayase, N. Arimura, S. Yanashita, T. Miyazaki. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry.* 27:3990-3996.
  11. Ghosal, D., and I.-S. You. 1988. Nucleotide homology and organization of chlorocatechol oxidation genes of plasmid pJP4 and pAC27. *Mol. Gen. Genet.* 211:113-120.
  12. Ghosal, D., I.-S. You, and I. C. Gunsalus. 1987. Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xyIE* of TOL pWWO. *Gene.* 55:19-28.
  13. Goto, M., M. Hattori, and K. Sugiura. 1975. Metabolism of pentachloro- and hexachlorobiphenyls in rats. *Chemosphere.* 4:177.
  14. Hague, R., and D. Schmedding. 1974. Aqueous solubility adsorption and behavior of polychlorinated biphenyl Arochlor 1254. *Environ. Sci. and Technol.* 8:139.
  15. Harayama, S., and M. Rekik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* 264:15328-15333.
  16. Harayama, S., M. Rekik, A. Wasserfallen, and A. Bairoch. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pWWO and NAH7 plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 210:241-247.
  17. Hegeman, G. D., C. F. Feist. 1969. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.* 100:869-877.
  18. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:454-457.
  19. Kiyohara, H., N. Kazutaka, and N. ryosaku. 1976. Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by *Aeromonas* sp. *Agr. Biol. Chem.* 40:1075-1082.
  20. Kohlmeier, N. A., and J. B. Howard. 1979. The primary structure of the  $\alpha$  subunit of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 254:7309-7315.
  21. 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.
22. Neidle, E. L., C. Hartnett, S. Bonitz, and L. N. Ornston. 1988. DNA sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2-dioxygenase I structural gene *catA*: evidence for evolutionary divergence of intradiol dioxygenases by acquisition of DNA sequence repetitions. J. Bacteriol. 170:4874-4880.
  23. Noda, Y., S. Nishidawa, K. I. Shiozuka, H. Kadokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasaki. 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 172:2704-2709.
  24. Safe, S., N. Platonow, and O. Hyzinger. 1975. Metabolism of chloro-biphenyls in the goat and cow. J. Agr. Food Chem. 23:259.
  25. Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, and K. Furukawa. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxy-biphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. Biochemistry 27:3990-3996.
  26. Yoshimura, H., and H. Yamamoto. 1973. Metabolic studies on polychlorinated biphenyl: complete structure and actual toxicity of the metabolites of 2,4-3',4'-tetrachlorobiphenyl. Chem. Pharm. Bull. 21: 2299.
  27. Zylstra, G. J., and D. T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. J. Bacteriol. 264:14940-14946.