

Pseudomonas sp. Strain DJ77로 부터 Phenanthrene 분해 유전자군의 클로닝과 대장균에서의 발현

김영창* · 윤길상 · 신명수 · 김홍식 · 박미선 · 박희진

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Pseudomonas sp. DJ77의 chromosomal DNA로 부터 6.8-kb *Xho*I 절편 상에 존재하는 phenanthrene 분해에 관련된 유전자군을 vector pBLUESCRIPT SK(+)에 클로닝하였다. 이렇게 얻은 재조합 plasmid인 pHENX7을 가지고 있는 JM101 균주는 3-methylcatechol을 노란색의 meta-cleavage 화합물로 전환할 수 있었다. 그러나 삽입된 절편의 방향이 반대가 되도록 제한된 pHENX7R은 extradiol dioxygenase 활성을 나타내지 않기 때문에 전사방향을 알 수 있었다. pHENX7과 이의 유도체들을 지니는 JM101 균주에서 PhnC(24 kDa), PhnD(31 kDa), PhnE(34 kDa), PhnF(15 kDa)의 4 polypeptide를 확인할 수 있었고 개개의 유전자의 위치와 범위를 알 수 있었다. 유전자 순서는 *phnC-phnD-phnE-phnF-phnG*이었으며, *phnC*, *phnD*, *phnE*, *phnG*는 각각 glutathione S-transferase, meta-cleavage compound hydrolase, extradiol dioxygenase, meta-cleavage compound dehydrogenase의 유전자이었다.

KEY WORDS □ *Pseudomonas*, cloning, hydrocarbon, phenanthrene, biodegradation, gene expression

방향족 탄화수소 물질들은 화학구조가 매우 안정하여 분해가 잘 되지 않기 때문에 자연계에 계속 축적되어 심각한 환경오염문제를 야기시키고 있다. Phenanthrene은 세개의 benzene 고리로 이루어진 방향족 탄화수소로서 석유나 나무가 연소될 때 주로 자연계에 오염되며, 포유동물에는 비교적 해가 적으나 조류, 어패류, 갑각류 등에는 상당히 해로운 것으로 알려지고 있다(15). Phenanthrene 자체는 돌연변이를 유발하지 않지만 K-region 대사산물인 phenanthrene 9,10-oxide, 9-phenanthrol, racemic phenanthrene trans-9,10-dihydrodiol 등은 돌연변이를 유발할 수 있기 때문에 환경보건학적으로 주목을 받고 있다(3).

Benzene이나 toluene과 같이 한 개의 benzene 고리로 구성되어 있는 물질과 naphthalene, biphenyl 등과 같이 두 개로 구성되어 있는 물질의 미생물에 의한 분해에 관해서는 많이 연구되어 있지만, phenanthrene, anthracene 등과 같은 다고리 방향족 탄화수소 물질의 미생물에 의한 분해에 대해서는 비교적 일찍 연구가 시작되었지만(5) 분해과정이 매우 복잡하기 때문에 아직 많이 진척되지 않고 있다. 미생물에 의한 phenanthrene의 분해 경로는 아직 완전히 밝혀지지는 않았지만 세 가지가 알려져 있다. 첫째는 Evans 등(5)이 *Pseudomonas*에서 밝힌 것으로 phenanthrene dioxygenase에 의해 3, 4번 탄소 위치에 산소 원자가 각각 한 개씩 결합되어 cis-phenanthrene dihydrodiol이 형성되고 이어 dehydroge-

nase에 의해 3,4-dihydroxyphenanthrene이 된다. 이 산물이 3,4-dihydroxyphenanthrene dioxygenase에 의해 meta-cleavage되며, 이어 1-hydroxy-2-naphthoic acid, 1,2-dihydroxynaphthalene으로 된 후, naphthalene의 대사경로를 따라 분해된다. 둘째로 *Aeromonas*와 *Alcaligenes faecalis* AFK2 등에서 밝혀진 것으로 phenanthrene이 1-hydroxy-2-naphthoate로 분해되는 과정은 첫번째 경로와 같지만(12), 그 후로는 2-carboxybenzaldehyde, o-phthalate, protocatechuate를 거쳐서 첫번째 경로와 다르게 분해된다(9). 셋째로 *Streptomyces*에서 밝혀진 것으로 phenanthrene이 cytochrome P-450 monooxygenase에 의해 arene oxide로 되고, 이것에 epoxide hydrolase가 작용하여 trans-dihydrodiol이 형성되는 것으로 알려지고 있다(15). 포유동물에서는 phenanthrene에 monooxygenase와 epoxide hydrolase가 작용하여 arene oxide를 만든 다음에 해독작용의 일환으로 glutathione S-transferase가 glutathione을 붙이거나 혹은 uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase가 glucuronidation을 일으켜서 배설되게 한다. 이상과 같이 phenanthrene 대사과정과 이에 관여하는 효소에 대한 연구는 어느 정도 진척되고 있으나, 분해 유전자의 구조와 발현조절에 관한 유전학적인 연구는 전무한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 phenanthrene 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. DJ77(7)로부터 방향족 탄화수

소의 분해과정에 관여하는 효소 중에서 노란색 화합물을 형성하기 때문에 쉽게 활성을 조사할 수 있는 extradiol dioxygenase의 유전자를 포함하여 그 주변에 존재하는 phenanthrene 분해 유전자군을 클로닝 하였다. 그리고 이 분해 유전자군을 이루고 있는 개개의 유전자의 위치를 밝혀내고 이들의 유전자 산물을 검출하였다.

재료 및 방법

균주, plasmid 및 배양

본 실험에 사용한 균주 및 plasmid의 특성은 Table 1과 같다. Phenanthrene 분해균주는 공장폐수에서 분리한 *Pseudomonas* sp. DJ77(7)이었으며 형질전환을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM101 또는 JM109를 사용하였다. 클로닝 vector로는 pBLUESCRIPT SK(+) phagemid(Stratagene Co., La Jolla, CA, U.S.A.)를 사용하였다. 완전배지로는 LB를 사용하였으며 phenanthrene 분해능을 검사하기 위한 배지로는 MM2 최소배지(8)를 사용하였다. Phenanthrene은 1%의 ethyl ether 용액으로 살포하여 얇은 막을 만들어서 공급하였다.

DNA 추출 및 조작

DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy 등(14)의 방법에 따라 추출하였으며 plasmid DNA는 Maniatis 등(10)의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한효소와

T4 DNA ligase는 New England Biolabs(Beverly, MA, U.S.A.), Boehringer Mannheim GmbH(Mannheim 31, Germany), Promega(Madison, WI, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였으며, 반응 조건은 제조 회사의 처방에 따랐다. 여러가지 재조합 DNA의 제조, 형질전환, 전기영동 및 사진촬영은 기본적으로 Maniatis 등(10)의 방법을 따랐다. 전기영동 후 필요한 절편들은 low melting-temperature(LMT) agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MD, U.S.A.)와 QIAEX gel extraction Kit(Qiagen Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.)를 사용하여 회수하였다.

효소의 활성 측정

Extradiol dioxygenase의 경우에는 100 mM의 3-methylcatechol 용액을 colony 위에 떨어뜨리고 30초 이내로 colony가 노란색을 띠면 extradiol dioxygenase 활성이 있는 것으로 판정하였다.

다른 효소들의 활성을 측정하는데 사용할 조효소액은 다음과 같이 제조하였다. 1×10^8 cells/ml까지 배양한 세포를 4°C에서 원심분리하여(10,000×g, 5분) 회수한 후 50 mM NaHPO₄-KH₂PO₄ 완충용액(pH 6.8)으로 2회 세척한 다음 얼음물 중탕내에서 30초 간격으로 15초 동안 10회 sonication함으로써 세포를 완전히 깨뜨렸다. 그리고 4°C에서 원심분리하여(10,000×g, 15분) 얻은 청정한 상층액을 반응에 사용하였다. meta-cleavage compound hydrolase와 meta-cleavage compound dehydrogenase의 활성은 Bayly

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains		
<i>Pseudomonas</i> sp.		
DJ77	Phn ⁺ Bph ⁺	7
<i>E. coli</i> JM101	supE thiΔ(lac-proAB)	11
JM109	F' [traD36proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] recA1 supE44 endA1 hsdR17gyrA96 relA1thiΔ(lac-proAB) F' [traD36proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15]	16
Plasmids		
pBLUESCRIPT SK(+)	Ap ^r	Stratagene Co.
pHENX7	pBLUESCRIPT SK(+) carrying 6.81-kb <i>Xho</i> I fragment of chromosomal DNA from DJ77	This work
pBX13	Deleted 5.5-kb <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II fragment of pHENX7	This work
pHX18	Deleted 5-kb <i>Hind</i> III fragment of pHENX7	This work
pPX40	Deleted 2.8-kb <i>Pst</i> I fragment of pHENX7	This work
pXH39	3.9-kb <i>Hind</i> III fragment of pHENX7 in SK(+)	This work
pEE11	1.14-kb <i>Eco</i> RI fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pEE14	1.36-kb <i>Eco</i> RI fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pEE25	2.35-kb <i>Eco</i> RI partial fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pSH15	1.55-kb <i>Sal</i> I- <i>Hind</i> III fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pSS21	2.1-kb <i>Sal</i> I fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pPH12	1.2-kb <i>Pst</i> I- <i>Hind</i> III fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pPP10	1-kb <i>Pst</i> I fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pXE08	0.8-kb <i>Xho</i> I- <i>Eco</i> RI fragment of pXH39 in SK(+)	This work
pPE17	<i>Pst</i> I-B fragment of pPP10 ligated to <i>Pst</i> I-A fragment of pEE11	This work

와 Wigmore(1)의 방법에 따라 측정하였다. Glutathione S-transferase의 활성은 100 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)에 1 mM의 glutathione과 1 mM의 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 기질로 첨가하고, 37°C에서 반응시킨 후, 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다(2).

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Polyacrylamide는 Aldrich Chemical Company Inc.(Milwaukee, WI, U.S.A.)로부터 구입하였고 분자량 측정을 위한 size marker로는 MW-SDS-200 Kit(Sigma Chemical Co., St. Louis, MD, U.S.A.)를 사용하였다. 시료, 완충용액, polyacrylamide gel은 Silhavy 등(14)의 방법을 따라 제조하였다. *lac* promoter를 유도하여 단백질을 대량으로 얻기 위해, OD₅₅₀이 0.1이 될 때까지 배양한 후 IPTG(isopropylthio- β -D-galactoside)를 최종농도 40 μ g/ml로 첨가하고 OD₅₅₀이 0.8이 될 때까지 계속해서 배양하였다(13). 이 배양액 1 ml를 취하여 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 균체에 50 μ l의 2X loading buffer를 넣고 2분간 100°C에서 끓인 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 30-50 μ l의 상등액을 취하여 15% gel에 loading하고 전기영동하였다.

결과 및 고찰

Phenanthrene 분해 유전자군의 cloning

지금까지 보고된 많은 탄화수소 분해유전자들은 plasmid나 chromosome 상에서 균을 이루어 존재하고 있다. Naphthalene 분해유전자의 경우에는 naphthalene이 salicylate로 분해되는데 관여하는 효소 유전자들이 operon I(또는 upper pathway operon)을 이루고 있으며, salicylate가 pyruvate로 분해되는데 관여하는 효소 유전자들이 operon II(또는 lower pathway operon)를 이루고 있는데 이 두 오페론도 서로 인접하여 존재한다(17). 이러한 유전자구조를 supraoperonic cluster라 한다. 본 연구에서는 DJ77의 phenanthrene 분해유전자들도 균을 이루어 존재할 것으로 추정하여 phenanthrene 분해대사과정 중 특이적으로 노란색 화합물을 형성하여 쉽게 검출할 수 있는 extradiol dioxygenase의 활성을 조사함으로써 extradiol dioxygenase 유전자를 포함하여 그 주변의 phenanthrene 분해 유전자군을 클로닝하는 전략을 사용하였다.

Naphthalene 대사과정에는 두 종류의 extradiol dioxygenase가 관여하고 있는데 하나는 upper pathway에 관여하는 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase이고 다른 하나는 lower pathway에 관여하는 catechol 2,3-dioxygenase이다. 이 중에서 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase는 기질특이성이 낮아 본래의 기질 뿐만 아니라 3-methylcatechol도 분해할 수 있다(6). 본 연구에서는 phenanthrene 대사과정 중에서 upper pathway에 관여하고 있는 extra-

diol dioxygenase 유전자를 클로닝할 확률을 높이기 위하여 catechol 대신에 3-methylcatechol을 기질로 사용하였다.

Phenanthrene 분해 유전자군을 cloning하기 위하여 *Pseudomonas* sp. DJ77의 chromosomal DNA와 pBLUESCRIPT SK(+) DNA를 제한효소 *Xho*I으로 처리한 후 ligation하여 *E. coli* JM101에 transformation하였다. X-gal(0.8 mg/ml), IPTG(40 μ g/ml)와 ampicillin(80 μ g/ml)을 첨가한 배지에서 흰색을 나타낸 colony에 100 mM의 3-methylcatechol 용액을 떨어뜨려 30초 내에 노란색을 띠는 3개의 transformant를 얻었다. 이들이 갖고 있는 재조합 plasmid를 각각 pHENX7, pHENX12, pHENX13이라 명명하고 DNA를 추출하여 제한효소로 분석한 결과, 모두 약 6.8 kb의 동일한 *Xho*I 절편이 삽입되어 있었다(Fig. 1A, lane 2) 그래서 이중 pHENX7만을 가지고 실험을 계속하였다. 6.8 kb의 *Xho*I 절편에 제한효소 *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I의 절단부위가 존재하나 *Bam*HI과 *Kpn*I의 절단부위는 존재하지 않았다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 이들 제한효소들을 단일 혹은 이중으로 복합 처리하여 생성된 절편의 크기를 측정, 분석함으로써 제한효소지도를 작성하였다(Fig. 2).

Extradiol dioxygenase 유전자(*phnE*)의 위치

Extradiol dioxygenase 유전자의 위치를 결정하기 위하여 pHENX7의 제한효소지도를 바탕으로 여러 가지 결실 유도체와 subclone을 제조하였고 이들의 효소역가를 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 pHENX7 DNA를 *Bam*HI과 *Bgl*II로 처리하여 제조한 pBX13 결실유도체와 *Pst*I으로 처리하여 제조한 pPX40 결실유도체는 모두 효소역가를 상실하였으나, *Hind*III로 절단하여 pBLUESCRIPT SK(+)의 *Hind*III 위치에 subcloning한 pXH39는 효소역가를 나타내었다. 이 pXH39 plasmid를 *Eco*RI, *Sal*I, *Pst*I으로 처리하여 조사한 결과, 삽입된 *Hind*III-3.9 kb 절편의 방향은 pHENX7에서의 방향과 같았다. Extradiol dioxygenase 유전자의 위치를 좀더 세밀하게 알아보기 위하여 pXH39로부터 pEE14, pEE11, pSS 21, pSH15, pPP10, pEE25 등의 유도체들을 제조하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 pEE25를 제외하고는 모두 효소활성을 갖고 있지 않았으며, 이 결과로부터 extradiol dioxygenase 유전자는 제한효소 지도상에서 2.27 kb 위치의 *Eco*RI, 2.4 kb 위치의 *Sal*I, 그리고 2.72 kb 위치의 *Pst*I 절단부위에 걸쳐 존재함을 알 수 있었다. 그래서 extradiol dioxygenase 유전자 부위만을 갖는 유도체를 만들기 위하여 pPP10의 *Pst*I-B 절편과 pEE11의 *Pst*I-A 절편을 회수한 후 ligation한 결과, 제한효소지도상의 1.8 kb 위치의 *Pst*I과 3.5 kb 위치의 *Eco*RI 사이에 있는 1.7-kb 절편만을 가지고 있는 pPE17을 얻었다(Fig. 1B). 예상했던대로 pPE17을 갖고있는 JM101은 extradiol dioxygenase 활성을 지니고 있어 3-methylcatechol을 분무시 수초내에

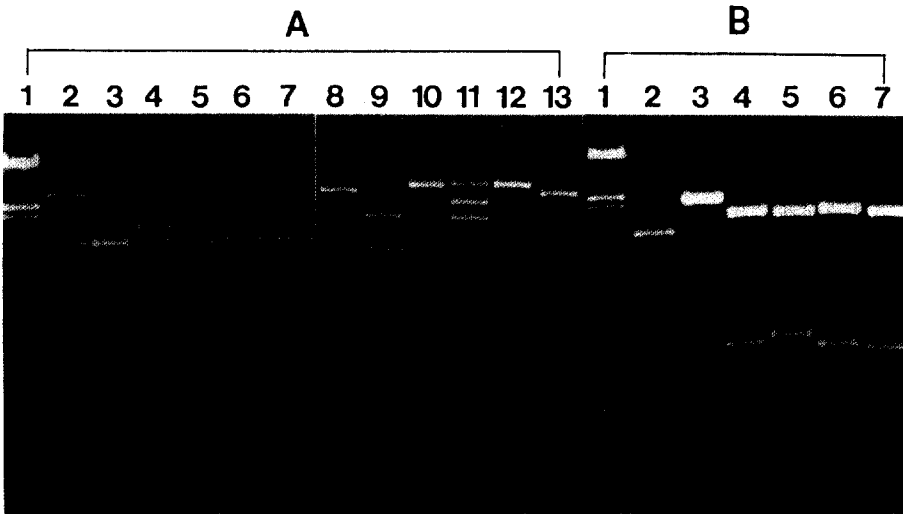


Fig. 1. Restriction analysis of pHENX7 (A) and its derivative pPE17 (B). Electrophoresis was carried out for 5 hrs at 50V. Agarose concentration was 0.8%. Size markers were λ DNA digested with HindIII and EcoRI(21.22, 5.15, 4.97, 4.26, 3.53, 2.03, 1.90, 1.58, 1.37, 0.94, 0.83, 0.56, 0.12 kb). (A) Lane 1, λ -HindIII-EcoRI; 2, pHENX7-XhoI; 3, pHENX7-XhoI-Sall; 4, pHENX7-Sall; 5, pHENX7-XhoI-EcoRI; 6, pHENX7-EcoRI; 7, pHENX7-EcoRI-Sall; 8, pHENX7-PstI; 9, pHENX7-PstI-BglII; 10, pHENX7-BglII; 11, pHENX7-BglII-BamHI; 12, pHENX7-BamHI; 13, pHENX7-BamHI-PstI. (B) Lane 1, λ DNA-HindIII-EcoRI; 2, pBLUESCRIPT SK(+)-PstI; 3, pPE17-HindIII; 4, pPE17-PstI; 5, pPE17-EcoRI; 6, pPE17-Sall; 7, pPE17-Sall-EcoRI.

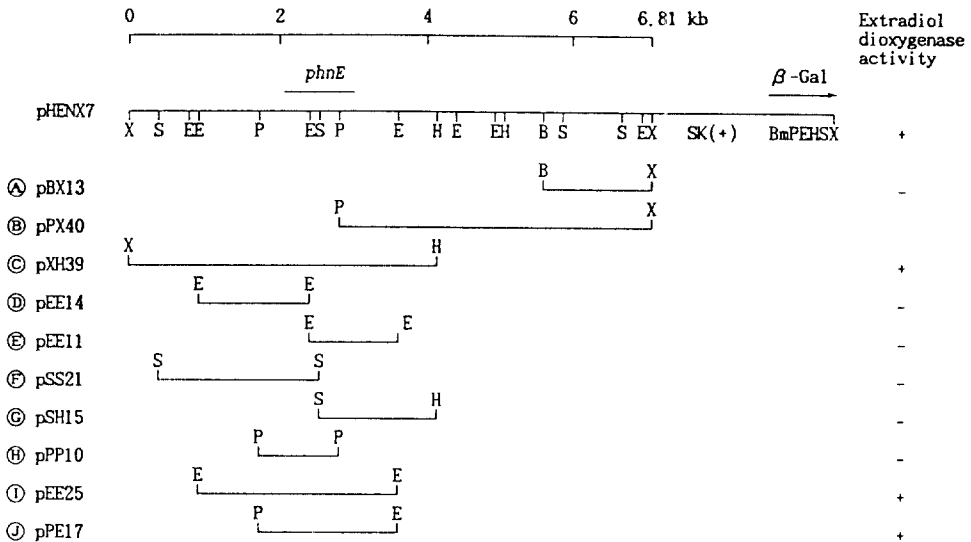


Fig. 2. Physical and genetic map of recombinant plasmid pHENX7 and its derivatives. The direction of transcription of the lac promoter is indicated as arrow heads. Abbreviations : E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, Sall; B, BglII; X, XhoI; Bm, BamHI. The extradiol dioxygenase activities of strains harboring the plasmids were determined by spraying 100mM 3-methylcatechol solution and is indicated by a '+' or '-' symbol.

colony가 노란색으로 변하였다.
Phenanthrene 분해 유전자군의 구조
pHENX7과 각종 subclone들로 부터 생성되는 단

백질을 비교 조사함으로써 유전자의 수, 위치, 크기를 알아보고자 하였다. 그리하여 각 결실 유도체를 지닌 균주들에서 단백질이 대량으로 만들어지도록 lac

promoter를 IPTG로 유도한 후 시료를 15%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하였다(Fig. 3).

지금까지 보고된 다른 extradiol dioxygenase들의 경우 대개 약 34 kDa의 한가지 subunit로 구성되어 있는데(6), Fig. 3의 5번 lane에서 볼 수 있듯이 PhnE 단백질만 암호화하고 있는 pPE17 유도체에서 약 34 kDa의 단백질이 다량 생성되었다. 그러나 pPE17과 부분적으로 같은 지역을 포함하고 있는 pEE14와 pPH12에서는 PhnE 단백질이 유도되지 않았다. 이 결과로부터 *phnE* 유전자는 크기가 약 920 bp로, 앞서 언급한대로 제한효소 지도상에서 2.27 kb 위치의 *EcoRI*과 2.72 kb 위치의 *PstI* 절단부위에 걸쳐 존재함을 확인하였다.

phnE 유전자의 바로 upstream 쪽에 위치한 1.4-kb *EcoRI* 절편만 삽입되어 있는 pEE14에서는 약 31 kDa의 단백질이 생성되었다(Fig. 3, lane 3). 이 단백질을 암호화하고 있는 유전자를 *phnD*로 명명하였다. pEE14와 부분적으로 같은 지역을 포함하고 있는 pXP16과 pPE17에서는 *PhnD* 단백질이 유도되지 않는 것으로 보아 *phnD* 유전자는 *PstI* 부위의 좌우에 걸쳐 약 850 bp 크기로 존재함을 알 수 있었다. *PhnD* 단백질은 meta-cleavage compound hydrolase의 활성을 나타내었다.

*phnDE*의 바로 upstream 쪽에 위치한 1.6-kb *XhoI-PstI* 절편만 삽입되어 있는 pXP16에서는 약 24 kDa의 단백질이 생성되었다(Fig. 3, lane 4). 이 단백질을 암호화하고 있는 유전자를 *phnC*로 명명하였다. pXP16과 부분적으로 같은 지역을 포함하고 있는 pXE08과 pEE14에서는 *PhnC* 단백질이 유도되지 않는 것으로 보아 *phnC* 유전자는 0.75 kb 위치의 *EcoRI* 부위와 0.88 kb 위치의 *EcoRI* 부위를 포함하여 약 650 bp 크기로 존재함을 알 수 있었다. *PhnC* 단백질은 glutathione S-transferase의 활성을 나타내었다. 현재까지 세균에서는 대장균과 *Proteus mirabilis* 등에서 glutathione S-transferase의 활성이 발견되었는데(4), 이 효소가 세균의 phenanthrene 대사에 어떤 역할을 수행하는지 매우 흥미롭다.

*phnCDE*의 바로 downstream 쪽에 위치한 1.2-kb *PstI-HindIII* 절편만을 갖고 있는 pPH12에서는 약 15 kDa의 단백질이 새로이 대량 합성되었는데(Fig. 3, lane 6). 이 단백질을 암호화하고 있는 유전자를 *phnF*로 명명하였다. *PhnF* 단백질이 phenanthrene 대사과정 중에서 어디에 관여하고 있는지는 앞으로 밝혀야 할 것이다.

*phnCDEF*의 downstream 부분을 갖고 있는 pPX40, pHX18, pBX13에서 새로운 단백질이 대량 합성되는 것을 발견하지는 못하였다. 그러나 아직 2-3개의 유전자가 더 존재할 수 있을 것으로 생각되어 우선 3.9 kb 위치에 존재하는 *HindIII* 절단부위를 중심으로 염기배열을 결정하고 상동성을 조사하였다(논문투고 준비중). 이 자료를 근거로 하여 효소 활성을 조사한 결과, meta-cleavage compound dehydrogenase 유

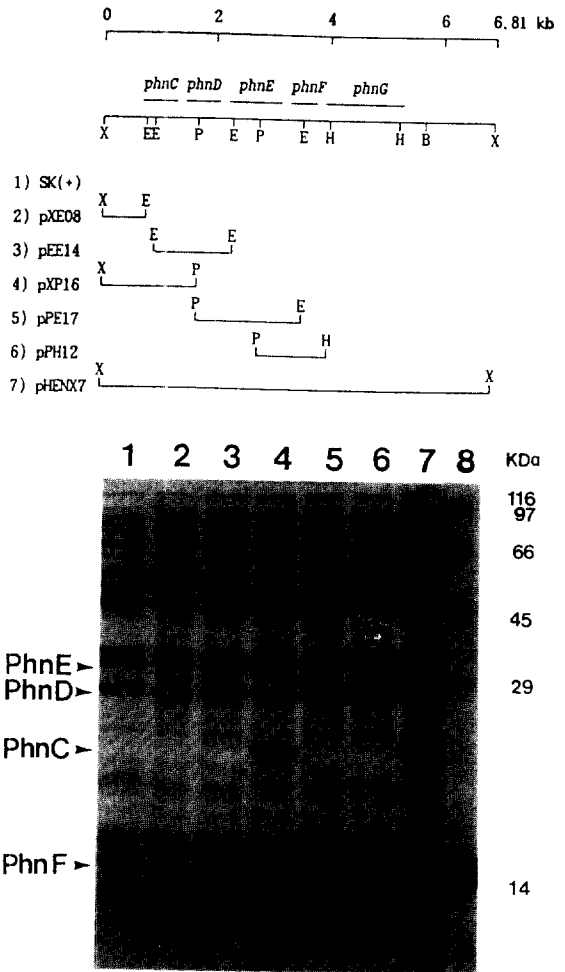


Fig. 3. Mapping of the gene products synthesized in vivo by plasmids. The lines indicate the extent of individual subclones constructed in pBLUESCRIPT SK(+). Abbreviation: X, *XhoI*; H, *HindIII*; E, *EcoRI*; P, *PstI*; B, *BglII*; Total cellular proteins of strains grown in the presence of isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) were electrophoresed on 0.1% sodium dodecyl sulfate-15% polyacrylamide gels. Lane 1, pBLUESCRIPT SK(+); 2, pXE08; 3, pEE14; 4, pXP16; 5, pPE17; 6, pPH12; 7, pHENX7; 8, molecular weight size markers.

전자가 존재함을 확인하고 이를 *phnG*로 명명하였다. 이상에서 살펴본 바와같이 pHENX7에 클로닝된 6.8-kb *XhoI* 절편에는 phenanthrene 분해 유전자들이 *phnCDEFG*의 순서대로 균을 이루어 존재하고 있음을 알았다.

E. coli에서 phenanthrene 분해유전자의 발현

pHENX7에 삽입된 6.8-kb *XhoI* 절편을 반대 방

향으로 삽입하여 제조한 pHENX7R의 경우에는 전혀 extradiol dioxygenase의 활성이 없었다. 이것은 extradiol dioxygenase 유전자의 전사과정이 vector에 존재하는 *lac promoter*에 의존하여 일어난다는 것을 뜻한다. 따라서 6.8-kb *XhoI* 절편에는 promoter가 없거나 있다하더라도 대장균 내에서는 작동하지 않는다고 해석할 수 있다. 여하튼 전사만 일어날 수 있으면 단백질이 합성될 수 있기 때문에 이 유전자의 해독 신호는 대장균 안에서도 잘 작동되는 것으로 생각된다. 또한 pHENX7에서 PhnE와 PhnC가 동시에 합성이 다량 유도되는데도 불구하고 그 사이에 위치한 유전자로 부터 생성되는 PhnD 단백질과 PhnF 단백질의 합성이 거의 유도되지 않는 것으로 보아 해독단계에서도 유전자 발현이 조절되고 있다고 생각된다.

감사의 말

본 논문은 1988년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Bayly, R.C. and G.J. Wigmore, 1973. Metabolism of phenol and cresols by mutants of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **113**, 1112-1120.
2. Booth, J., E. Boyland and P. Sims, 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* **79**, 516-524.
3. Bucker, M., H.R. Glatt, K.L. Platt, D. Aynir, Y. Ittah, J. Blum and F. Oesch, 1979. Mutagenicity of phenanthrene and phenanthrene K-region derivatives. *Mutat. Res.* **66**, 337-348.
4. Di Ilio, C., A. Aceto, R. Piccolomini, N. Allocati, A. Faraone, L. Cellini, G. Ravagnan and G. Federici, 1988. Purification and characterization of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* **255**, 971-975.
5. Evans, W.C., H.N. Fernley and E. Griffiths, 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring fission mechanism. *Biochem. J.* **95**, 819-831.
6. Harayama, S. and M. Rekik, 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* **264**, 15328-15333.
7. Kim, C.K., J.W. Kim, Y.C. Kim and T. I. Mheen, 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. J. Microbiol.* **24**, 67-72.
8. 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.
9. Kiyohara, H., N. Kazutaka and N. Ryosaku, 1976. Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by *Aeromonas* sp. *Agr. Biol. Chem.* **40**, 1075-1082.
10. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
11. Messing, J., 1979. A multipurpose cloning system based on the single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* **2**, 43-48.
12. Nagao, K., N. Takizawa and H. Kiyohara, 1988. Purification and properties of *cis*-phenanthrene dihydrodiol dehydrogenase in *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2621-2623.
13. Noda, Y., S. Nishikawa, K.-I. Shiozuka, H. Kadokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasaki, 1990. Molecular cloning of the protococatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **172**, 2704-2709.
14. Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist, 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
15. Sutherland, J.B., J.P. Freeman, A.L. Selby, P.P. Fu, D.W. Miller and C.E. Cernilia, 1990. Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Arch. Microbiol.* **154**, 260-266.
16. Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing, 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
17. Yen, K.M. and I.C. Gunsalus, 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH 7. *J. Bacteriol.* **162**, 1008-1013.

(Received September 18, 1991)

(Accepted October 7, 1991)

ABSTRACT: Molecular Cloning of a Gene Cluster for Phenanthrene Degradation from *Pseudomonas* sp. Strain DJ77 and Its Expression in *Escherichia coli*

Kim, Young-Chang*, Kil-Sang Youn, Myeong-Su Shin, Hong-Shik Kim, Mi-Seon Park, and Hee-Jin Park(Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, KOREA)

We cloned a gene cluster encoding phenanthrene-degrading enzymes on a 6.8-kb *Xho*I fragment from the *Pseudomonas* sp. DJ77 chromosomal DNA into the vector pBLUESCRIPT SK(+). The resultant clone, containing the recombinant plasmid pHENX7, was able to convert 3-methylcatechol to a yellow *meta*-cleavage compound. Since the pHENX7R in which the DNA insert was cloned in the opposite orientation lacked extradiol dioxygenase activity, the direction of transcription was established. Four polypeptides, PhnC (24 kDa), PhnD (31 kDa), PhnE (34 kDa), and PhnF (15 kDa), were identified in *E. coli* JM101 transformed with several pHENX7-derived plasmids. The locations and extents of individual genes were determined by subcloning. The gene order was *phnC-phnD-phnE-phnF-phnG*, and *phnC*, *phnD*, *phnE*, and *phnG* genes encoded glutathione S-transferase, *meta*-cleavage compound hydrolase, extradiol dioxygenase, *meta*-cleavage compound dehydrogenase, respectively.