

Southern Hybridization에 의한 Biphenyl 및 4-Chlorobiphenyl 분해유전자들의 상동성 분석

남정현 · 김치경* · 이재구¹ · 이길재²
충북대학교 미생물학과, ¹농화학과, ²한국교원대학교 생물교육과

Homology Analysis Among the Biphenyl and 4-Chlorobiphenyl Degrading Genes by Southern Hybridization

Nam, Jung-Hyun, Chi-Kyung Kim*, Jae-Koo Lee¹ and Kil-Jae Lee²

Department of Microbiology and

¹Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

²Department of Biology Education, Korea National University of Education,

Cheongwon 363-791, Korea

Abstract — The homology among the genes coding for degradation of biphenyl(BP) and 4-chlorobiphenyl(4CB) was comparatively analyzed by Southern hybridization in several BP/4CB degrading bacterial strains. As the hybridization results of their genomic DNAs with *pcbABCD* as the DNA probe, the group of *Pseudomonas* sp. DJ-12, P08 and P27 strain was separated by the group of P20 and P1242 strains. The *P. pseudoalcaligenes* KF707 showed the hybridization signal which was homologous to the group of DJ-12, but they had different restriction endonuclease sites. The *pcbAB* genes in pCU1 recombinant plasmid from *Pseudomonas* sp. DJ-12 appeared to be homologous to *bphAB* genes in pKTF20 cloned from *P. pseudoalcaligenes* KF707, but the C genes in both strains were not homologous. The *bphABC* in pKTF20 showed the signals homologous to the *cbpACB* in pAW6194 cloned from *P. putida* OU83, but homologous signal was not found between the *pcbABCD* genes in pCU1 and the *cbpADCB* genes in pAW6194 recombinant plasmid.

Polychlorinated biphenyls(PCBs)는 물에서의 용해도가 높고 휘발성이 낮아 자연계에 축적되고 지용성이 높아 생물체내에 축적되어 독성을 나타내기 때문에 미생물에 의한 PCBs의 분해에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. PCBs중에서 가장 간단한 구조인 4-chlorobiphenyl(4CB)의 분해에 관여하는 세균은 대개 그람 음성세균으로 보고되었다(1). 이 4CB는 *meta*-cleavage pathway에 의하여 4-chlorobenzoate(4CBA)로 전환된 다음 4CBA를 축적하는 균주군과 4CBA의 dechlorination 과정에 의해 4-hydroxybenzoic acid로 분해하는 균주군으로 분류되었다(19). Furukawa 등(5)은 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707의 chromosomal DNA로부터 7.2 kb의 *bphABC* 유전자를 cloning하였으며, 이 *bphABC* 유전자를 probe로 이용하여 자연계에서 분리한 biphenyl 분해균주에 대하여

Southern hybridization 실험을 하였다. 그 결과 분해유전자군의 염기 서열과 제한효소 인식부위가 거의 유사한 균주군과 상동성을 전혀 나타내지 않는 균주군 그리고 상동성을 나타내지만 제한효소 인식부위가 전혀 다른 균주군 등으로 분류하였다(5). 한편 *Walia* 등은 *Pseudomonas putida* OU83의 *cbpABCD* 유전자군을 DNA probe로 이용하여 토양 환경에 존재하는 4CB 분해 세균을 colony hybridization 기법으로 탐색하여 4CB로 오염된 환경에서 분해 유전자군의 분포 및 지역적 편차를 확인한 바 있다(17). 이와같은 방향족 탄화수소의 대사경로 및 분해유전자군의 상이성은 유전자의 transfer, deletion, duplication, recombination 등의 여러가지 진화학적 변화에 기인한다고 Furukawa 등(5)은 보고하였다.

Biphenyl(BP) 및 4CB 분해유전자군의 염기서열의 상이성은 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP)을 *meta*-cleavage compound로 분해하는데 관여하는 효소인 2,3-DHBP dioxygenase(*bphC* 유전자의 산물, BphC)

Key words: *pcb* genes, homology, BP/4CB degradation, Southern blot hybridization

*Corresponding author

에서 아미노산의 서열 및 효소학적 특성을 상호 비교한 연구가 보고되었다. 예를 들면 *P. pseudoalcaligenes* KF707과 *P. pseudoalcaligenes* KF715은 아미노산 서열에 있어서 91.4%의 상동성을 나타냈으나 KF715는 operon 구조에 있어서 *bphABC*와 *bphD* 유전자 사이에 X 부위를 가지고 있지 않았으며(8), KF707과 *P. paucimobilis* Q1은 아미노산 서열에서는 서로 상이하였으나 BphC의 효소학적 특성은 거의 유사함을 나타내었다(16).

본 실험에 사용된 BP 및 4CB 분해균주들은 *Pseudomonas* sp. DJ-12(11)를 비롯한 P08, P27 등의 균주들은 *P. pseudoalcaligenes* KF707(7)과 대사경로가 상이하였으며(19), *P. putida* OU83(10, 11)과 P20, P1242 균주들은 BP 및 4CB의 대사경로 뿐 아니라 유전자군의 구조에 있어서 상이함을 나타내었다(20). 따라서 PCBs 분해 세균의 연구에 대한 궁극적인 목표가 실제로 자연환경에 적용할 수 있는 우수한 균주의 개발에 있다면, 분해세균들이 자연환경에서 안정하게 생존하면서 분해능이 유지되도록 하는 생태학적 연구가 필요한 것이다. 그러므로 BP 및 4CB 분해유전자들 사이의 다양성 또는 유사성에 대하여 DNA probe를 이용하여 비교 탐색하는 연구 보고들이 주목받는 것이다(3, 11).

본 연구에서는 한국에서 분리한 *Pseudomonas* sp.

DJ-12의 *pcbABCD* 유전자(7, 12, 19) 및 일본에서 분리한 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC*(4, 6, 8) 그리고 미국에서 분리한 *P. putida* OU83의 *cbpABCD*(9, 10, 17) 유전자들을 각각 DNA probe로 이용하여 biphenyl 및 4CB 분해균주의 genomic DNA 뿐 아니라 그들의 분해유전자군의 상동성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

분해 균주 및 Plasmids

Pseudomonas sp. DJ-12(11)와 더불어 P08, P20, P27, P1242 균주들(19)은 biphenyl(BP) 및 4-chlorobiphenyl(4CB)을 단일 탄소원으로 첨가한 MM2 고체 배지에서 분해환 또는 *meta*-cleavage product인 노란색의 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorobiphenyl)hexa-2,4-dienoic acid(HOPDA)를 형성하는 균주들을 사용하였다. *P. pseudoalcaligenes* KF707과 *bphABC* 유전자를 포함하는 pKTF20 plasmid는 일본 Kyushu대학의 Furukawa 박사로부터 분양받았다. 또 *P. putida* OU83과 *cbpABCD* 유전자를 포함하는 pAW6194 plasmid는 미국의 Oakland대학의 Walia 박사로부터 분양받았다. 각 균주 및 plasmid의 특성은 Table 2에서와 같다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant marker(s)	Sources
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	BP ⁺ , 4CB ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Kim <i>et al.</i> (11)
Isolate No. P08	BP ⁺ , 4CB ⁺ , 4CBA ⁺	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P20	BP ⁻ , 4CB ⁺ , 4CBA ⁻	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P27	BP ⁻ , 4CB ⁺ , 4CBA ⁺	Yun <i>et al.</i> (19)
Isolate No. P1242	BP ⁻ , 4CB ⁻ , 4CBA ⁻	Yun <i>et al.</i> (19)
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	BP ⁺ , 4CB ⁺	Furukawa <i>et al.</i> (6)
<i>P. putida</i> OU83	BP ⁺ , 4CB ⁺	Walia <i>et al.</i> (17)
Plasmids		
pCU1	6.4 kb <i>Eco</i> RI fragment(<i>pcbABCD</i>) of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+), Ap ^r	Han <i>et al.</i> (7)
pCU101	2.2 kb <i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I fragment(<i>pcbAB</i>) of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+), Ap ^r	Han <i>et al.</i> (7)
pCU103	3 kb <i>Sal</i> I <i>Eco</i> RI fragment(<i>pcbCD</i>) of <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12 cloned in pBluescript SK(+), Ap ^r	Kim <i>et al.</i> (12)
pKTF20	7.2 kb <i>Xho</i> I fragment(<i>bphABC</i>) of <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707 cloned in pCU119, Ap ^r	Furukawa <i>et al.</i> (6)
pAW6194	9.4 kb <i>Eco</i> RI fragment(<i>cbpABCD</i>) of <i>P. putida</i> OU83 cloned in pCU18, Ap ^r	Walia <i>et al.</i> (17)

Abbreviation: BP, biphenyl; 4CB, 4-chlorobiphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; Ap^r, ampicillin.

배지 및 배양조건

Pseudomonas sp. DJ-12를 비롯한 자연계 분리균주 (P08, P20, P27, P1242)들과 pKTF20 및 pAW6194를 각각 가지고 있는 재조합균주들(*P. pseudoalcaligenes* KF707과 *P. putida* OU83)은 ampicillin(100 µg/ml)이 포함된 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone, 10 g/l; Bacto yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l, pH 7.0)에서 배양하였다. 그리고 pCU1, pCU101, pCU103을 각각 가지고 있는 *E. coli* CU1, CU101 그리고 CU103 재조합균주들은 ampicillin(100 µg/ml)과 tetracycline(15 µg/ml)이 포함된 LB 배지에서 배양하였다. 자연계

분리균주들은 30°C 에서 그리고 재조합균주들은 37°C 에서 각각 배양하였다. 그리고 고체배지의 경우는 한천을 1.5%로 첨가하여 사용하였다.

DNA의 분리 및 전기영동

각 균주들의 total genomic DNA는 Ausubel 등(3)의 방법에 따라 추출하였다. 재조합 plasmid인 pCU1, pCU101, pCU103, pKTF20, pAW6194 등의 분리는 Sambrook 등(13)의 alkaline lysis 방법에 따라 시행하였고, 분리된 chromosomal DNA 및 plasmid DNA에 대한 제한효소들의 처리는 Maniatis 등(13)의 방법을 사용하였다. 제한효소로 처리된 total genomic DNA 및 재조합 plasmid들의 전기영동은 horizontal electrophoresis system을 이용하여 0.7~1.0%의 agarose gel에서 실시하였다. 전기영동 buffer로는 TAE (40 mM Tris-acetate; 1 mM EDTA) buffer 또는 TBE (45 mM Tris-borate; 1 mM EDTA) buffer를 사용하여 5 V/cm 이하로 전기영동하였다. 전기영동 후 gel은 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 용액에서 40분간 염색하여 UV-transilluminater(305 nm)로 관찰하였고, 사진촬영은 UV DNA SLII camera system(Seolin, Seoul, Korea)을 이용하여 실시하였다.

Table 2. Growth characteristics of BP and 4CB degrading bacterial strains on several aromatic hydrocarbons

Bacterial strains	Catabolic pathway			
	BP→ BA	BA→ 4OHBA	4CB→ 4CBA	4CBA→ 4OHBA
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	++	++	+++	+++
Isolate No. P08	++	++	+++	+++
Isolate No. P20	+++	-	+++	-
Isolate No. P27	++	++	++	+++
Isolate No. P1242	++	-	+++	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	+++	-	+	-
<i>P. putida</i> OU83	++	-	+++	-

Abbreviation: BP, biphenyl; BA, benzoate; 4OHBA, 4-hydroxybenzoate; 4CB, 4-chlorobiphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; +++, good growth; ++, moderate growth; -, no growth or very poor growth.

DNA probe의 제조

DNA probe를 제조하기 위한 주형 DNA는 Fig. 1에서와 같이 5가지를 사용하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 클로닝된 pCU1의 *pcbABCD*를 포함하는 6.4 kb *EcoRI* 절편(probe 1)과 pCU101의 *pcbAB*를 포함하는 2.2 kb *EcoRI-SalI* 절편(probe 2) 그리고

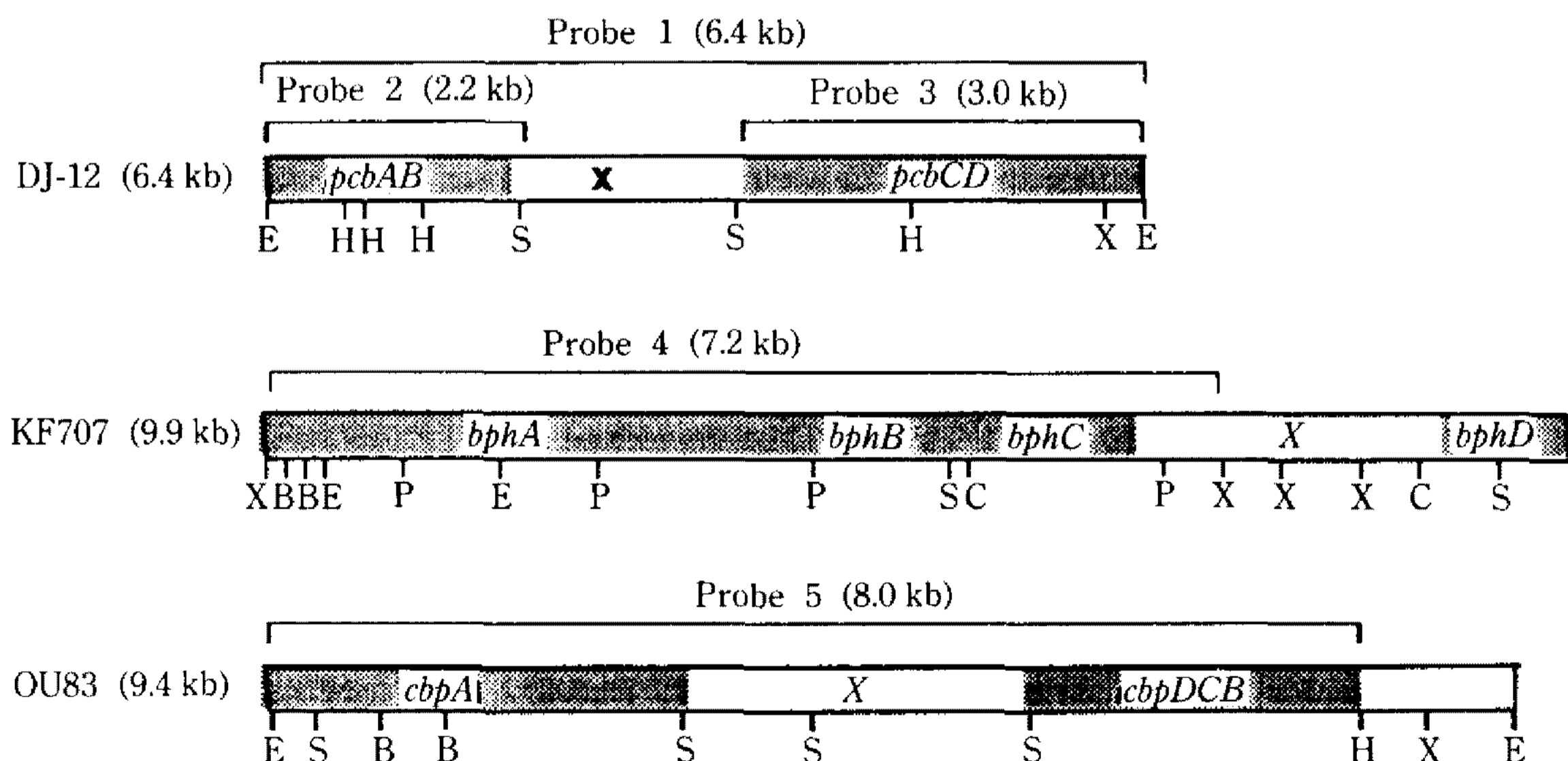


Fig. 1. Organization of three BP and 4CB degrading genes and DNA fragments used for the probes. E, *EcoRI*; S, *SalI*; X, *XhoI*; P, *PstI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; C, *ClaI*.

pCU103의 *pcbCD*를 포함하는 3.0 kb *EcoRI-SalI* 절편 (probe 3)을 비롯하여 *P. pseudoalcaligenes* KF707에서 클로닝된 pKTF20의 *bphABC*를 포함하는 7.2 kb *XhoI* 절편(probe 4)과 *P. putida* OU83에서 클로닝된 pAW 6194의 *cbpABCD*를 포함하는 8.0 kb *EcoRI-HindIII* 절편(probe 5)을 사용하였다.

다양한 제한효소로 절단한 재조합 plasmid들은 1% agarose gel에 전기영동한 다음 주형 DNA의 band를 GENE CLEAN II Kit(BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA)로 agarose gel로부터 순수분리하였다. DNA probe의 labeling은 nick translation system과 biotin-14-dATP(BRL, Gaithersburg, MD., USA)을 이용하여 상품회사의 사용지침에 따라 표식하였다.

Southern Hybridization

상기의 방법에 따라 BP 및 4CB 분해균주들의 total genomic DNA 또는 분해유전자를 포함하는 recombinant plasmid들을 전기영동한 gel은 Sambrook 등(13)의 방법에 따라 denaturation solution(1.5 M NaCl ; 0.5 N NaOH)에서 45분간 denaturation하였고, neutralizing buffer(1 M Tris[pH 7.4] ; 1.5 M NaCl)를 이용하여 15분간 2회 중화하였다. Nylon membrane (Hybond-N ; Amersham International plc., Amersham, UK)으로의 DNA transfer는 Southern의 방법(14)을 원용하여 제조회사의 지침에 따라 실시하였으며, transfer buffer로는 20×SSC(3 M NaCl ; 0.3 M sodium citrate)를 사용하였다. Prehybridization은 0.1 ml/cm²의 비율로 prehybridization solution(5×SSC ; 0.1% BSA, fraction V ; 0.1% ficoll ; 0.1% polyvinylp-

yrolidone ; 0.5% SDS ; 40% formamide ; 100 µg/ml herring sperm DNA)을 첨가한 후 hybridization bag (BRL, Gaithersburg, MD., USA)으로 옮겨 42°C 에서 2시간 동안 실시하였다. 그 후 각각의 DNA probe 를 포함하는 hybridization solution(5×SSC ; 0.5% SDS ; 40% formamide ; 5% dextran sulfate ; 100 µg/ml herring sperm DNA)에서 18시간 동안 Hybridization을 실시하였다. Hybridization에 의한 상동성 DNA 절편은 BluGENE Nonradioactive Nucleic Acid Detection System(BRL, Gaithersburg, MD., USA)을 사용하여 회사의 사용지침에 따라 발색시켰다.

결 과

BP 및 4CB 분해균주의 Genomic DNA에 대한 Hybridization

본 연구에 사용된 BP 및 4CB 분해 균주들의 total genomic DNA를 *HindIII*, *EcoRI*, *SalI* 등의 제한효소로 처리한 후, Fig. 1에서와 같이 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbABCD*(probe 1) 및 *pcbAB*(probe 2) 그리고 *pcbCD*(probe 3) 유전자로 제조된 DNA probe를 사용하여 Southern hybridization을 실시한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3 그리고 Fig. 4에서와 같다. *HindIII*로 절단한 total genomic DNA에 재조합 plasmid pCU1의 6.4 kb *EcoRI* 절편을 DNA probe(probe 1)로 Southern hybridization을 실시하였을 때, Fig. 2에서와

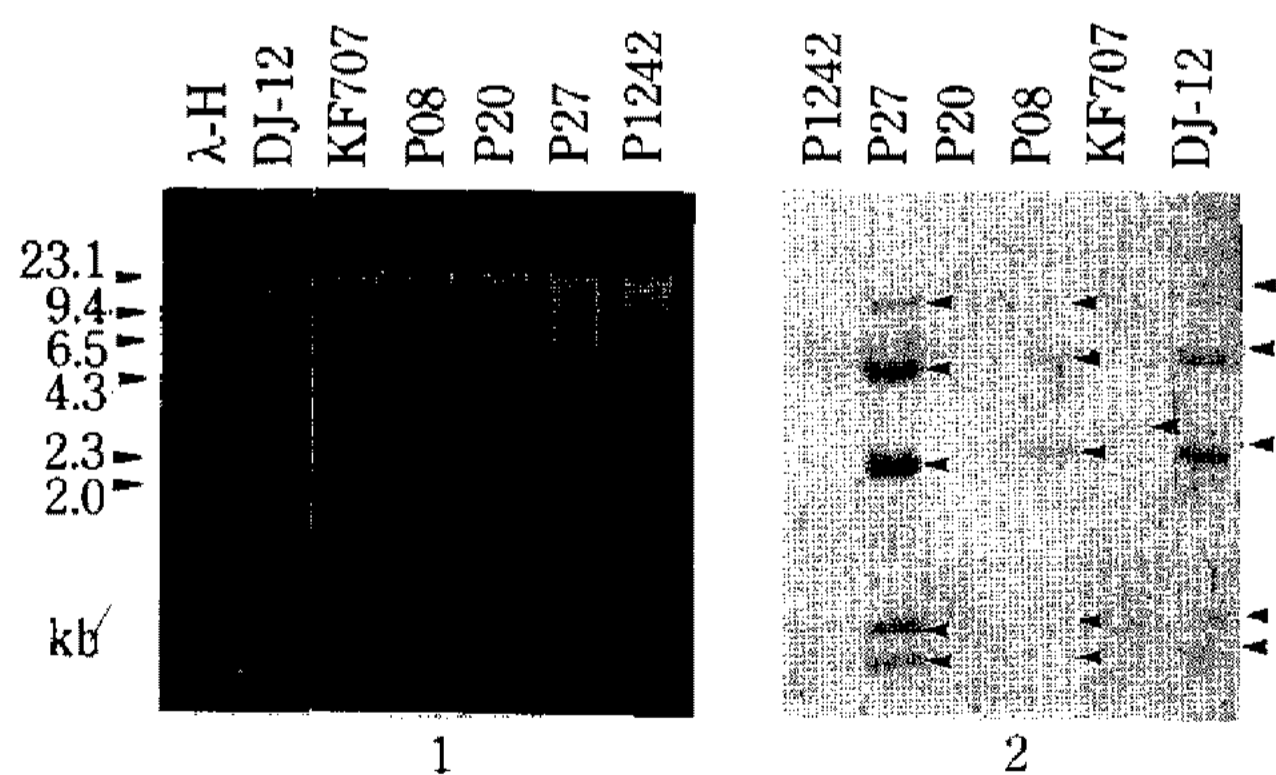


Fig. 2. Southern hybridization of total genomic DNAs of several BP and 4CB degrading strains with the *pcbABCD* genes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 as the DNA probe.

Gel electrophoresis (1) of the total genomic DNAs digested with *HindIII* and Southern blot (2) of the gel hybridized with the *pcbABCD* genes (probe 1).

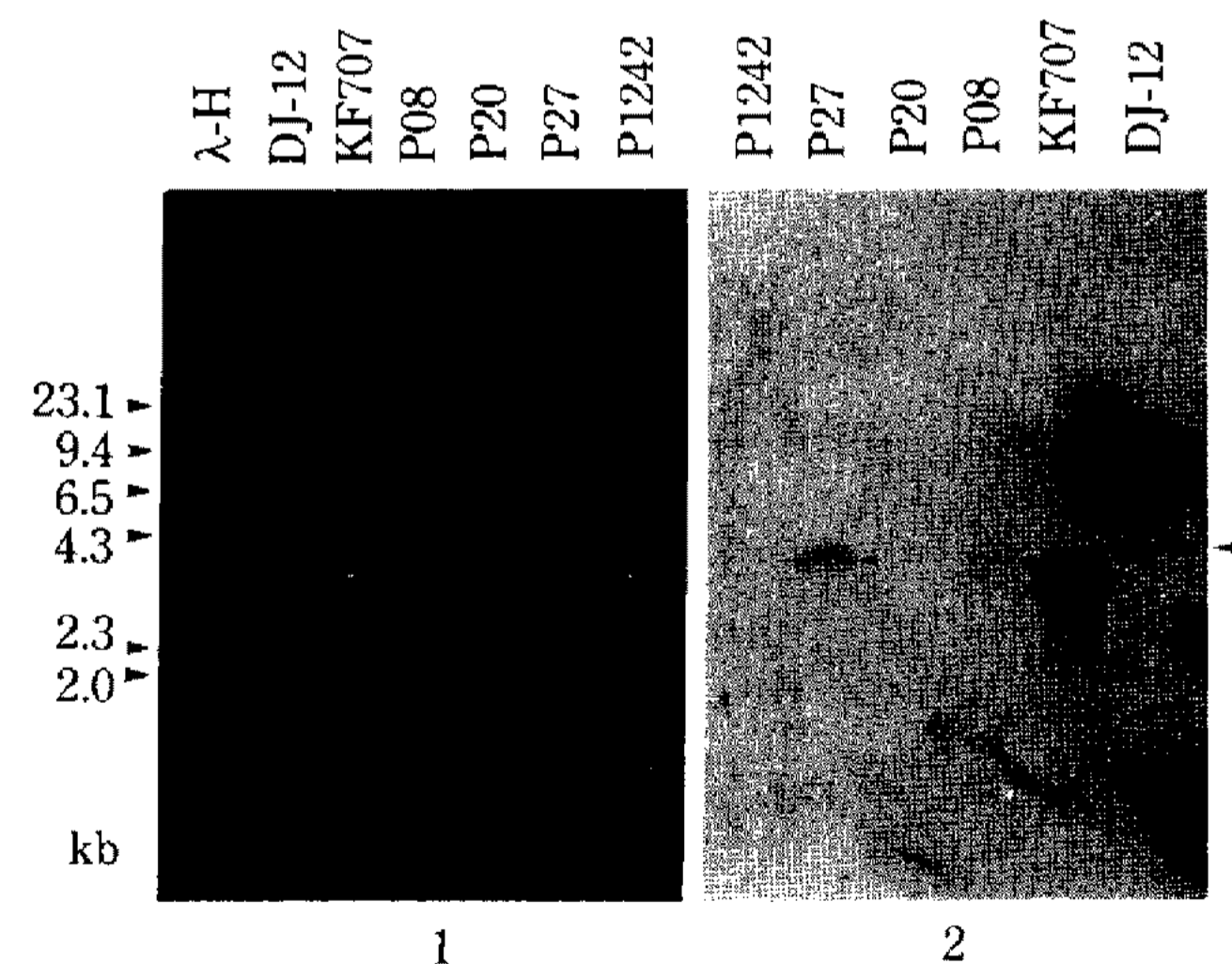


Fig. 3. Southern hybridization of total genomic DNAs of several BP and 4CB degrading strains with *pcbAB* genes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 as the DNA probe. Gel electrophoresis (1) of the total genomic DNAs digested with *EcoRI-SalI* and Southern blot (2) of the gel hybridized with the *pcbAB* genes (probe 2).

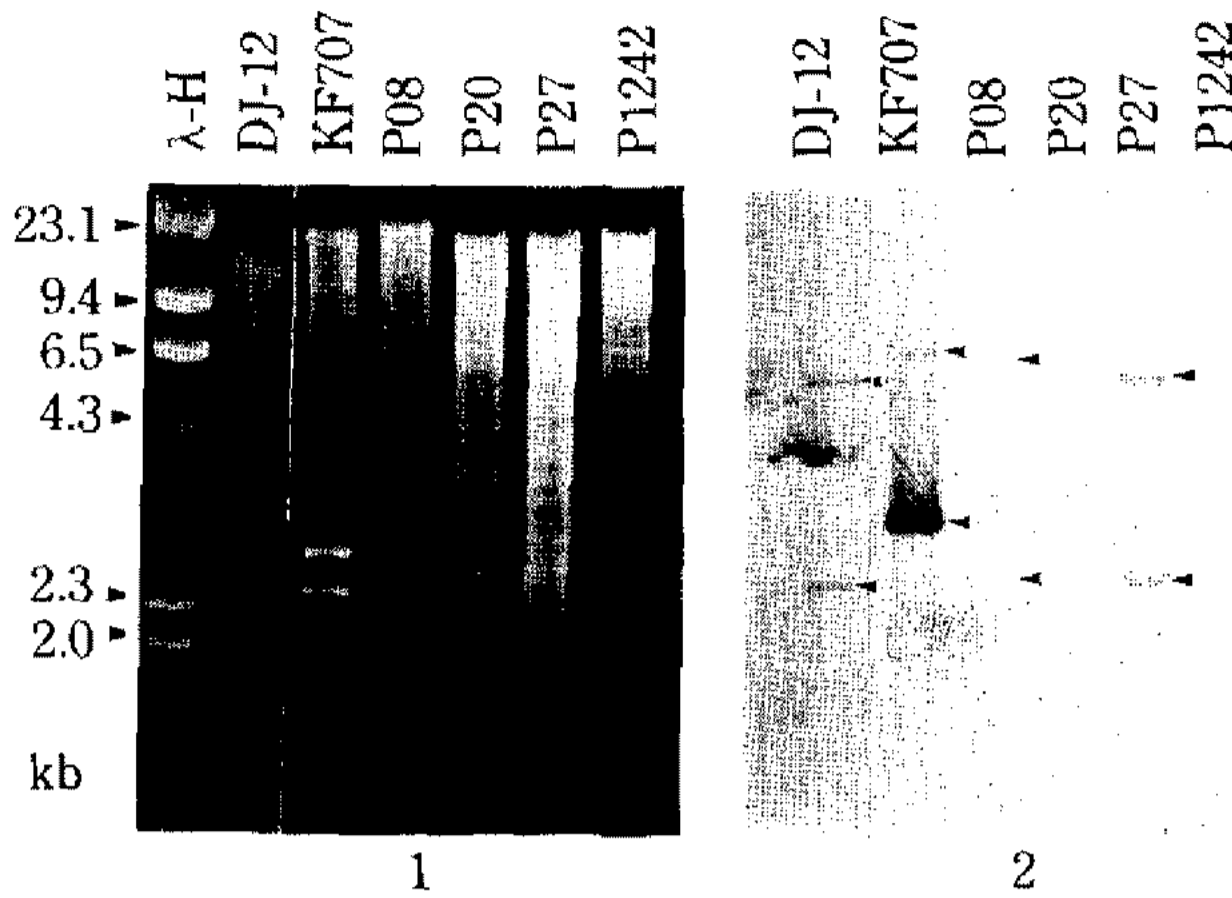


Fig. 4. Southern hybridization of total genomic DNAs of several BP and 4CB degrading strains with *pcbCD* genes of *Pseudomonas* sp. DJ-12 as the DNA probe. Gel electrophoresis (1) of the total genomic DNAs digested with *Hind*III and Southern blot (2) of the gel hybridized with the *pcbCD* genes (probe 3).

Table 3. Hybridization of the total genomic DNAs of different BP and 4CB degrading bacteria with *pcbACD* as the probe

	Hybridization					
	DJ-12	P08	P27	P20	P1242	KF707
<i>pcbABCD</i> (pCU1)	+	+	+	-	-	+
<i>pcbAB</i> (pCU101)	+	+	+	-	-	+
<i>pcbCD</i> (pCU103)	+	+	+	-	-	+

+: hybridization, -: not hybridization.

같이 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 P08 그리고 P27에서 모두 동일한 위치에서 hybridization signal이 5개가 나타났다. 그러나 이들과 BP 및 4CB의 대사과정이 상이한 P20 및 P1242 균주에서는 hybridization signal이 나타나지 않았다. 그리고 BP 분해균주인 *P. pseudoalcaligenes* KF707에서는 DJ-12와는 전혀 다른 크기의 절편(3.2 kb)에서 signal이 나타났다.

Probe 2(*pcbAB* 유전자)로 hybridization을 한 결과는 Fig. 3에서와 같이 DJ-12와 P08 그리고 P27에서만 동일한 hybridization band가 확인되었으며 *pcbAB* 유전자를 포함하고 있는 2.2 kb 크기의 절편에서만 signal이 나타났다. Probe 3(*pcbCD* 유전자)으로 hybridization을 한 결과는 Fig. 4에서와 같이 DJ-12와 P08 그리고 P27에서 *pcbC*와 *pcbD* 유전자를 각각 가지고있는 2.4 kb와 5.0 kb 절편에서 signal이 나타

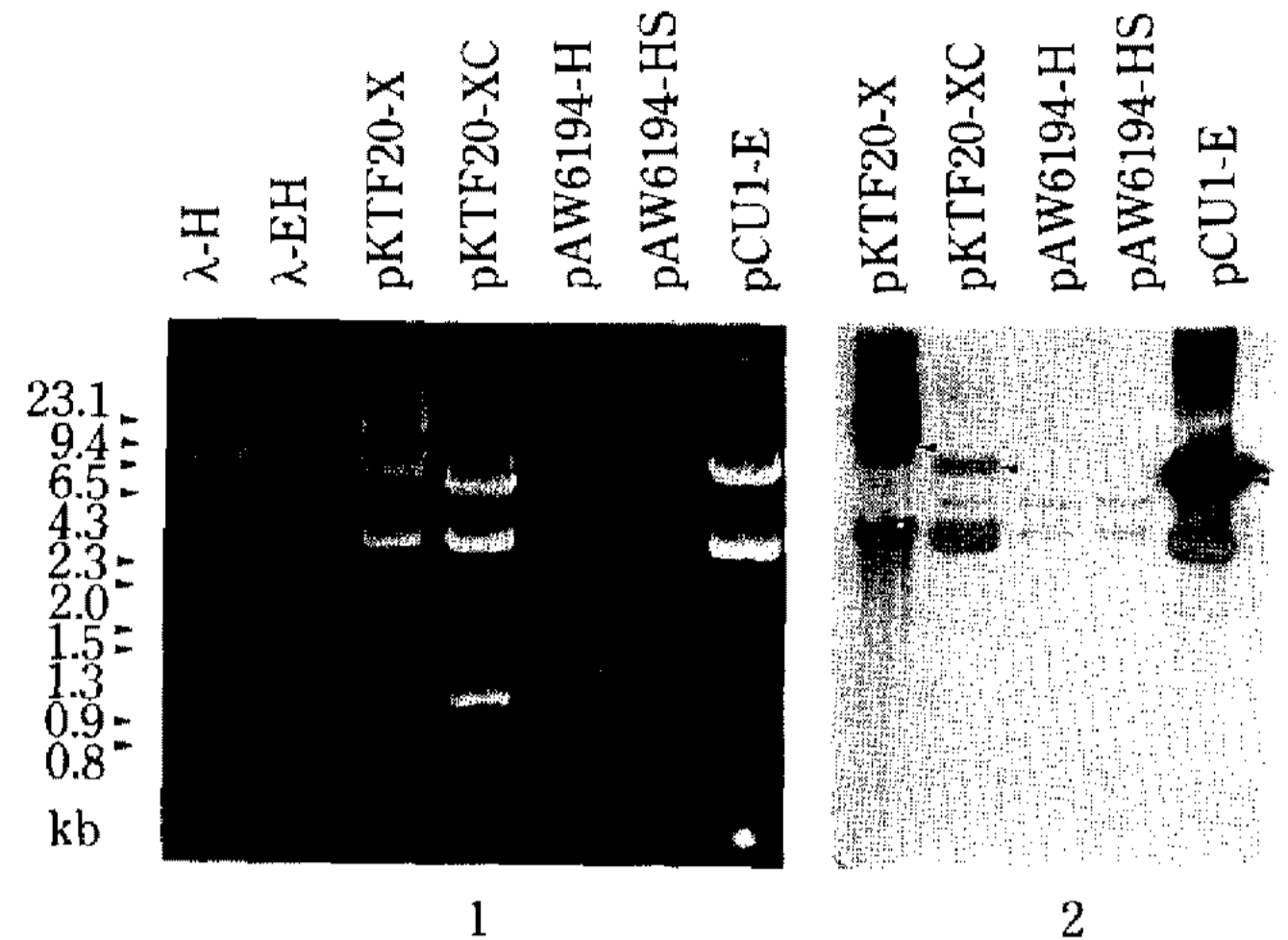


Fig. 5. Southern hybridization of several recombinant plasmids with *pcbABCD* genes.

Gel electrophoresis (1) of the recombinant plasmids digested with restriction enzymes and Southern blot (2) of the gel hybridized with the *pcbABCD* genes (probe 1). Abbreviation: λ-H, λ-*Hind*III size marker; E, *Eco*RI; S, *Sal*I; H, *Hind*III; X, *Xho*I; C, *Cla*I.

남으로서 *pcbABCD* 유전자군의 제한효소 인식 부위는 이들 균주에서 일치한다는 것을 알 수 있었다. *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcb* 유전자군을 3가지의 DNA probe로 사용하였을 때, BP 및 4CB 분해 균주들에 대한 hybridization 결과를 종합해 보면 Table 3과 같다. 자연계에서 분리한 BP 및 4CB 분해균주들은 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcb* 유전자군과 상동성이 있는 균주군(DJ-12, P08, P27)과 DNA 염기서열에 상동성이 없는 균주군(P20, P1242)으로 구분할 수 있었다. 그러나 *P. pseudoalcaligenes* KF707은 DJ-12 균주군과 상동성은 있지만, 제한효소 인식부위가 상이한 균주군으로 분류되었다.

BP 및 4CB 분해유전자의 상동성

Pseudomonas sp. DJ-12 및 *P. pseudoalcaligenes* KF707 그리고 *P. putida* OU83의 chromosomal DNA로부터 BP 및 4CB 분해유전자를 각각 클로닝한 재조합균주들이 가지고있는 recombinant plasmid들(pCU1, pKTF20, pAW6194)에서 BP 및 4CB 분해유전자군인 *pcbABCD*와 *bphABC* 그리고 *cbpADCB*들의 상동성을 비교 분석하였다. Fig. 1에서와 같이 pCU1의 6.4 kb *Eco*RI 절편(probe 1)과 pKTF20의 7.2 kb *Xho*I 절편(probe 4) 그리고 pAW6194의 8.0 kb *Eco*RI-*Hind*III 절편(probe 5)을 각각 probe로 사용하여 각 재조합 plasmid들과 Southern hybridization하에 분해유전자들의 상동성을 조사한 결과는 Fig. 5와 Fig. 6과 같다. pCU1의 6.4 kb *pcbABCD* 유전자를 probe로

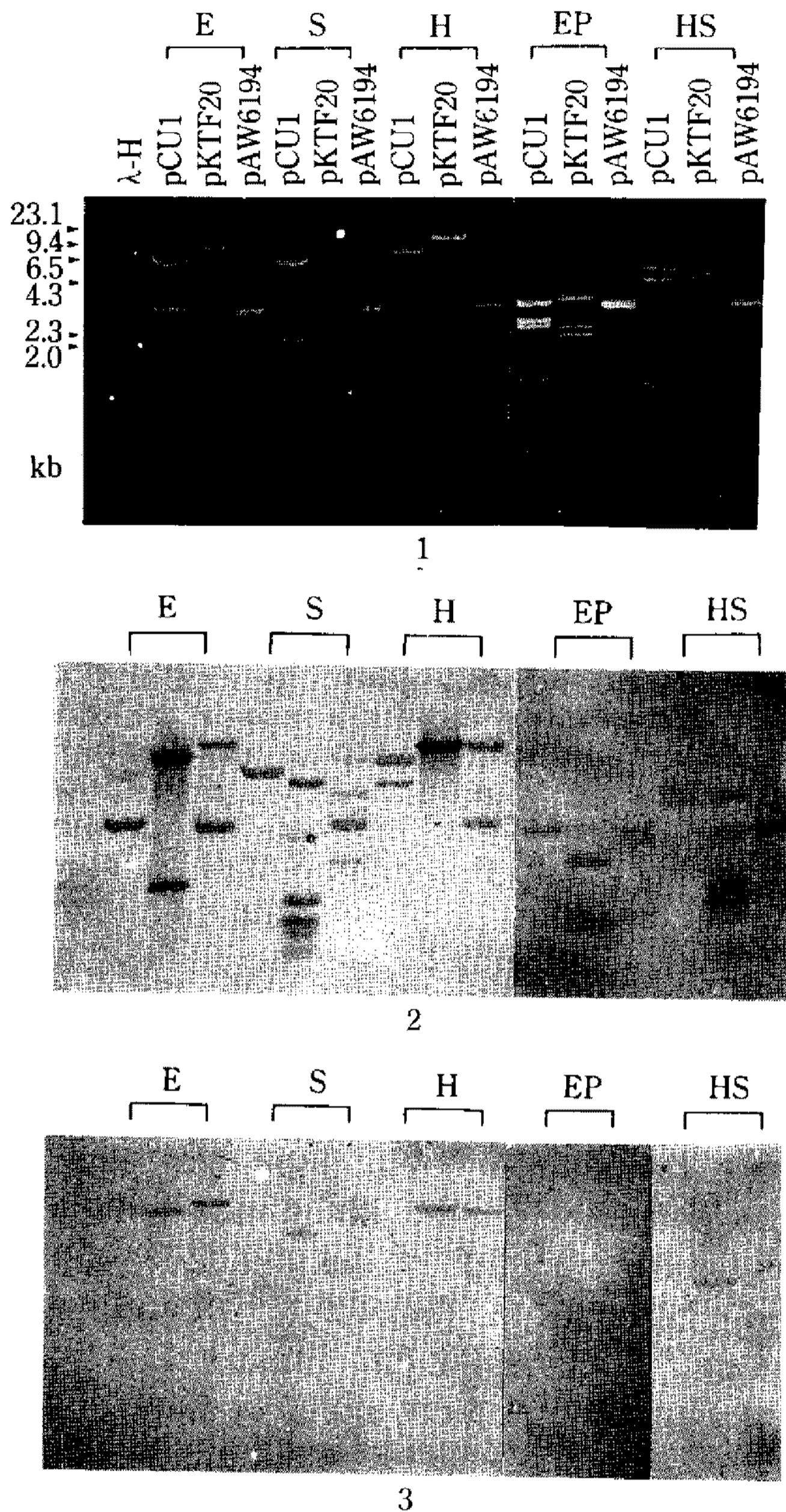


Fig. 6. Southern hybridization of several recombinant plasmids with *bphABC* and *cbpADCB* genes. Gel electrophoresis (1) of the recombinant plasmid digested with restriction enzymes and Southern blot (2 and 3) of recombinant plasmids with *bphABC* (probe 4) and *cbpADCB* genes (probe 5). Abbreviation: λ -H, λ -HindIII size marker; E, *EcoRI*; S, *Sall*; H, *HindIII*; EP, *EcoRI-PstI*; HS, *HindIII-Sall*.

사용하였을 때(Fig. 5), *bphAB* 유전자를 가지고 있는 pKTF20의 6.0 kb *XhoI-ClaI* 절편(pKTF20-XC)에서는 hybridization signal이 나타났으나, *bphC* 유전자를 가지고 있는 1.2 kb의 *XhoI-ClaI* 절편에서는 signal이 나타나지 않았다. 이에 반하여 pAW6194는 *cbpADCB* 유전자를 가지고 있는 8.0 kb의 *HindIII* 절편(pAW6194-H)과 *HindIII*와 *Sall*으로 절단하였을 때 *cbpA*

Table 4. Homology among the BP and 4CB degrading genes include in different hybrid plasmids

Probes	<i>pcb</i> (pCU1)		<i>bph</i> (pKTF20)		<i>cbp</i> (pAW6194)	
	AB	CD	AB	C	A	DCB
<i>pcbABCD</i> (pCU1)	+	+	+	-	-	-
<i>bphABC</i> (pKTF20)	+	NT	+	+	+	+
<i>cbpADCB</i> (pAW6194)	-	-	+	+	+	+

+ : hybridization, - : not hybridization, NT: not tested.

및 *cbpDCB* 유전자를 각각 가지고 있는 3.1 kb와 2.9 kb 절편(pAW6194-HS)에서 모두 signal이 나타나지 않았다.

이러한 결과는 pKTF20의 *bphABC* 유전자와 pAW6194의 *cbpADCB* 유전자를 DNA probe로 사용한 Fig. 6의 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 7.2 kb의 *bphABC* 유전자를 DNA probe로 이용하였을 때(Fig. 6-2), 재조합 plasmid pCU1를 비롯하여 pAW6194에서 hybridization signal이 나타났다. 그러나 pAW6194의 8.0 kb *cbpADCB* 유전자를 DNA probe로 사용하였을 때에는(Fig. 6-3), pCU1의 *pcbABCD* 유전자에서는 signal이 전혀 나타나지 않았으며, pKTF20의 *bphABC* 유전자에서 강한 signal이 나타났다. BP 및 4CB 분해유전자군의 염기서열의 상동성을 DNA hybridization에 의하여 분석한 결과는 Table 4와 같다. *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 cloning된 pCU1의 *pcbAB* 유전자는 *P. pseudoalcaligenes* KF707에서 cloning된 pKTF20의 *bphAB*와 상동성이 높았으나 C 유전자 사이에는 상동성이 없었다. 그리고 pKTF20의 *bphABC*와 *P. putida* OU83에서 cloning된 pAW6194의 *cbpACB* 사이에는 상동성이 높았으나 pCU1의 *pcbABCD*와 pAW6194의 *cbpADCB* 사이에는 상동성이 없었다.

고 찰

Pseudomonas sp. DJ-12를 비롯한 P08과 P27 균주군은 P20과 P1242 균주군과 DNA hybridization에 의한 상동성이 없었다. 이는 BP 및 4CB와 4CBA를 분해하는 특징을 지닌다는 점에서 P20 및 P1242 균주군과 상이한 결과(19)와 일치되는 현상이다. Yates 등(18)은 PCBs 분해균주인 *Pseudomonas* strain LB 400의 분해유전자군을 DNA probe로 사용하여 7개의

자연계 분리균주들의 염기서열을 비교하였을 때 4CB를 4CBA까지만 분해하는 특성을 지닌 *Alcaligenes eutrophus*에서만 상동성을 나타내었고, 다른 균주들에서는 상동성을 보이지 않았다고 보고하였다. 그러한 점으로 보아 *Pseudomonas* strain LB400은 *Alcaligenes eutrophus*와 함께 본 연구에서 사용한 P20과 P1242와 상동성이 있을 것으로 판단된다. 그러므로 BP 및 4CB의 분해에 대한 경로가 동일한 균주군에서는 그 분해유전자의 염기서열에서도 상동성이 높다고 생각할 수 있다.

현재까지 알려진 BP 및 4CB의 분해유전자군은 모두 하나의 operon으로 구성되어 있다. 예를 들면 Khan 등(10, 11)에 의해 *P. putida* OU83으로부터 클로닝된 *cbpA-DCB*와 Furukawa 등의 *P. pseudoalcaligenes* KF707(6)와 *P. pseudoalcaligenes* KF715(8)에서 얻어진 *bphABC-D* 및 *bphABCD* 그리고 Han 등(7)의 *pcbAB-CD* 유전자들이 그러하다. 이와같이 각 균주들이 가지고 있는 분해유전자의 배열이 상이하며, 특히 2,3-DHBP을 *meta*-cleavage compound까지 분해하는데 관여하는 DJ-12의 *pcbC*(12) 및 KF707의 *bphC*(4) 그리고 OU83의 *cbpC*(10) 유전자들 사이에서는 *bphC*와 *cbpC*만이 상동성을 가지고 있었다. 그러나 이들과 *pcbC* 유전자 사이에서는 hybridization이 전혀 일어나지 않는 상이성을 보여주었다. Taria 등(16)은 *P. pseudoalcaligenes* KF707과 *P. paucimobilis* Q1의 *bphC* 유전자 산물인 2,3-DHBP dioxygenase가 효소학적인 특성은 매우 유사하지만 아미노산 서열에서는 약 38%의 상동성을 나타냈으며, 효소사이의 immuno-blotting의 결과도 상이했다고 보고하였다. Sung 등(15)은 2,3-DHBP dioxygenase(*bphC* 유전자의 산물, BphC)의 기질특이성을 측정하였을 때 DJ-12의 경우에는 2,3-DHBP을 비롯하여 catechol과 3-methylcatechol에도 활성을 가지고 있었으나, 이에 반하여 Khan 등(10)의 *P. putida* OU83의 경우에는 catechol과 4-methylcatechol 그리고 4-chlorocatechol에 활성을 나타내며, Taira 등(16)의 *P. pseudoalcaligenes* KF707에서는 오직 2,3-DHBP에만 활성을 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 DJ-12의 *pcbC* 유전자는 *bphC* 및 *cbpC* 유전자들과 염기서열의 차이 뿐 아니라 효소의 기질특이성에서도 상이함을 나타내었다.

이에 대하여 Asturias 등(2)은 그람 양성 세균인 *Rhodococcus globerulus* P6에서 세 가지의 서로 다른 2,3-DHBP dioxygenase를 클로닝하였고, 이들의 DNA 염기서열이 서로 상이하다고 보고하였다. 이와같이 하나의 균주에서도 염기서열이 다른 세 가지의 2,3-DHBP dioxygenase가 존재할 수 있고 PCB의 분해에

있어 세 가지의 다른 분해경로가 가능할 뿐 아니라 각 분해유전자들은 서로 다른 환경조건에 의하여 발현된다고 하였다.

본 실험의 결과를 종합해 볼 때 BP 및 4CB 분해균주가 가지고 있는 분해경로의 차이와 분해유전자의 염기서열의 차이가 일치한다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Furukawa 등(4)에 의해 주지된 바와 같이 동일한 방향족 탄화수소의 분해에 관여하는 유전자들은 유전학적 분화에 의해 분리된 superfamilies라고 생각되며, 이러한 차이는 다양한 환경에 적응하기 위해 진화되었다고 생각할 수 있다.

사 사

본 논문은 교육부의 학술연구조성비(1989년 유전공학연구)에 의하여 이루어졌으며, 연구결과의 일부는 과학재단의 SRC(서울대 분자미생물학연구센터)의 연구비로 수행되었음.

요 약

Biphenyl 및 4-chlorobiphenyl을 분해하는 자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12, P08, P27, P1242 외에 *P. pseudoalcaligenes* KF707과 *P. putida* OU83 균주들에 대하여 분해유전자들 사이의 상동성을 DNA hybridization 방법으로 조사하였다. *pcbABCD*를 DNA probe로 하여 각 균주의 genomic DNA에 대한 hybridization 결과, *Pseudomonas* sp. DJ-12, P08, P27의 균주군과 P20, P1242의 균주군으로 구분되었으며, KF707 균주는 DJ-12 균주군과 hybridization은 일어났으나 제한효소 인식부위가 상이하였다. *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 cloning된 pCU1의 *pcbAB* 유전자는 *P. pseudoalcaligenes* KF707에서 cloning된 pKTF20의 *bphAB*와 상동성이 높게 나타났으나, C 유전자 사이에는 상동성이 없었다. 그리고 pKTF20의 *bphABC*와 *P. putida* OU83에서 cloning된 pAW6194의 *cbpACB* 사이에는 상동성이 높게 나타났으나, pCU1의 *pcbA-BCD*와 pAW6194의 *cbpADCB* 사이에는 상동성이 없었다.

참고문헌

1. Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse. 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the *meta*-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1375-1385.

2. Asturias, J. and K.N. Timmis. 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the Gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* **175**: 4631-4640.
3. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
4. Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaika, and S. Hayashida. 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl(*bph* operon) and toluene(*tod* operon). *J. Bacteriol.* **175**: 5224-5232.
5. Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/ polychlorinated biphenyl catabolism: Some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* **171**: 5467-5472.
6. Furukawa, K. and T. Miyazaki. 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398.
7. Han, J.J., T.K. Sung, and C.K. Kim. 1993. Cloning and expression of *pcbAB* genes from *Pseudomonas* sp. DJ-12 in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* **31**: 129-135.
8. Hayase, N., K. Taira, and K. Furukawa. 1990. *Pseudomonas putida* KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis and expression in soil bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1160-1164.
9. Khan, A. and S. Walia. 1989. Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 798-805.
10. Khan, A. and S. Walia. 1991. Expression, localization and functional analysis of polychlorinated biphenyl degradation genes *cbpABCD* of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1325-1332.
11. Kim, C.K., J.W. Kim, and Y.C. Kim. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**: 122-128.
12. Kim, C.K., T.K. Sung, J.H. Nam, Y.C. Kim, and J.K. Lee. 1994. Cloning and expression of *Pseudomonas* sp. DJ-12 *pcbCD* genes in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* **32**. in press.
13. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
14. Southern, E.M. 1975. Detection of specific segments among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
15. Sung, T.K, J.H. Nam, and C.K. Kim. 1993. Enzymatic properties of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase purified from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 150-156.
16. 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 PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochem.* **27**: 3990-3996.
17. Walia, S., A. Khan, and N. Rosenthal. 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 254-259.
18. Yates, J.R. and F.J. Mondello. 1989. Sequence similarities in the genes encoding polychlorinated biphenyl degradation by *Pseudomonas* strain LB 400 and *Alcaligenes eutrophus* H850. *J. Bacteriol.* **171**: 1733-1735.
19. Yun, D.J., J.J. Han, and C.K. Kim. 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4-chlorobiphenyl catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 53-59.

(Received January 26, 1994)