

## 4-Chlorobiphenyl을 분해하는 *Pseudomonas* sp. P20의 *pcb* 유전자군의 클로닝

남정현 · 김치경\*

충북대학교 자연대학 미생물학과

### Cloning of *pcb* Genes in *Pseudomonas* sp. P20 Specifying Degradation of 4-Chlorobiphenyl

Nam, Jung-Hyun and Chi-Kyung Kim\*

Department of Microbiology, College of Natural sciences, Chungbuk National University,  
Cheongju 360-763, Korea

**Abstract** — *Pseudomonas* sp. P20 was a bacterial isolate which has the ability to degrade 4-chlorobiphenyl(4CB) to 4-chlorobenzoic acid via the process of *meta*-cleavage. The recombinant plasmid pCK1 was constructed by inserting the 14-kb *Eco*RI fragment of the chromosomal DNA containing the 4CB-degrading genes into the vector pBluescript SK(+). Subsequently, *E. coli* XL1-Blue was transformed with the hybrid plasmid producing the recombinant *E. coli* CK1. The recombinant cells degraded 4CB and 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) by the *pcbAB* and *pcbCD* gene products, respectively. The *pcbC* gene was expressed most abundantly at the late exponential phase in *E. coli* CK1 as well as in *Pseudomonas* sp. P20, and the level of the *pcbC* gene product, 2,3-DHBP dioxygenase, expressed in *E. coli* CK1 was about two-times higher than in *Pseudomonas* sp. P20. The activities of 2,3-DHBP dioxygenase on catechol and 3-methylcatechol were about 26 to 31% of its activity on 2,3-DHBP, but the enzyme did not reveal any activities on 4-methylcatechol and 4-chlorocatechol.

4-Chlorobiphenyl(4CB)에서 4-chlorobenzoic acid (4CBA)로의 미생물에 의한 분해과정에는 4가지의 효소가 관여한다. 4-Chlorobiphenyl dioxygenase와 dihydrodiol dehydrogenase의 작용에 의하여 4CB는 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl로 변환되고, 이 물질은 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase에 의해 *meta*-cleavage 방법으로 개환이 일어나 황색의 2-hydroxy-6-oxo-6-(4-chloro-phenyl) hexa-2,4-dienoic acid(HO-PDA : *meta*-cleavage product)가 생성된다. 이 분해 산물은 다시 MCP(*meta*-cleavage compound) hydro-lase에 의해 4CBA와 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid로 변환된다(1).

본 연구실에서 분리한 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 4CB 분해유전자군인 *pcbABCD*(DJ-12)를 클로닝하여 그들의 특성과 발현에 대하여 보고한 바(7, 10, 17) 있으며, *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbABCD* 유전자

군은 *P. pseudoalcaligenes* KF707(6), *P. putida* OU 83(7), *P. testosteroni* B-356(1) 등의 균주들로부터 클로닝된 4CB 분해유전자군들과는 분자생물학적 그리고 효소학적으로 많은 상이성을 보여 주었다. 특히 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 *pcbABCD*를 probe로 사용하여 자연계에서 분리한 4CB 분해균주들과 DNA hybridization을 실시하였을 때 두가지 군으로 구분되었다(20). 즉, 4CB에서 4CBA를 거쳐 protocatechuate로 계속 분해하면서 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 4CB 분해유전자군과 상동성을 가지고 있는 균주군(P 08, P27) 그리고 4CB에서 4CBA까지만 분해하며 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 분해유전자군과 상동성이 없는 균주군(P20, P1242)으로 분류되어 4CB 분해유전자의 다양성이 보고되었다(14). *Pseudomonas* sp. P 20은 *Pseudomonas* sp. DJ-12에 비하여 4CB의 분해 경로 및 분해유전자군의 구조 및 염기서열이 매우 상이한 균주로서 4CB를 4CBA까지만 분해하여 4 CBA를 축적하였다. 그 중 *pcbC*(DJ-12) 유전자로부터 암호화되는 2,3-DHBP dioxygenase의 특성에 대한

**Key words:** 4-Chlorobiphenyl, degradation, cloning of *pcb* genes, *Pseudomonas* sp. P20

\*Corresponding author

연구를 통하여 다른 균주들과의 상호 비교를 실시한 바 있다(17).

그러므로 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. DJ-12 및 *P. putida* OU83(18)과 DNA 염기서열과 4CB의 분해특성이 상이하며, *P. pseudoalcaligenes* KF707(5)과도 상이한 특성을 지닌 *Pseudomonas* sp. P20의 균주로부터 4CB를 분해하는 *pcbABCD*(P20) 유전자군을 클로닝하여 그 구조를 파악하였으며, *E. coli*에서의 *pcbC* 유전자의 발현을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 화학물질

자연계에서 분리된 균주들 중 4CB를 강력히 분해하여 그 분해산물인 4CBA를 축적하는 균주인 *Pseudomonas* sp. P20을 4CB 분해유전자군의 cloning에 사용하였다. 클로닝 vector로는 pBluescript SK(+) phagemid(Stratagene Co., La Jolla, CA, USA)를 사용하였으며, 그들의 특성은 전보(17)에 기술된 바와 같다.

본 실험에 사용한 화학물질들 중 4-chlorobiphenyl, 4-chlorocatechol, 2,4-dichlorobiphenyl은 동경화성(Tokyo, Japan)으로부터 구입하였으며, 2,3-DHBP는 Wako Chemical Ind., Ltd.(Osaka, Japan)으로부터 구입하였다. 4CBA, 4-hydroxybenzoate, protocatechuate, catechol, 4-methylcatechol, 및 3-methylcatechol과 같은 중간대사물질들은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### DNA 조작

*Pseudomonas* sp. P20로부터 chromosomal DNA의 분리는 ampicillin(100 µg/ml)이 함유된 LB 배지에서 배양한 후 Ausubel 등(3)의 방법에 따라 추출하였다. 재조합 plasmid DNA의 분리는 역시 ampicillin(100 µg/ml)과 tetracycline(15 µg/ml)이 함유된 LB 배지에서 배양한 후 Sambrook 등(15)의 alkaline lysis 방법을 사용하였다.

본 연구에 사용한 T4 DNA ligase와 제한효소는 모두 KOSCO Co.(KOREA)로부터 구입하였으며, 반응조건은 제조회사의 사용지침에 따랐다. 제한효소절단, DNA ligation, 형질전환, 전기영동 등의 기술은 Sambrook 등(15)의 방법을 사용하였다.

### 4-Chlorobiphenyl 분해 유전자군의 cloning

4-Chlorobiphenyl의 분해를 암호화하는 *pcb*(P20)

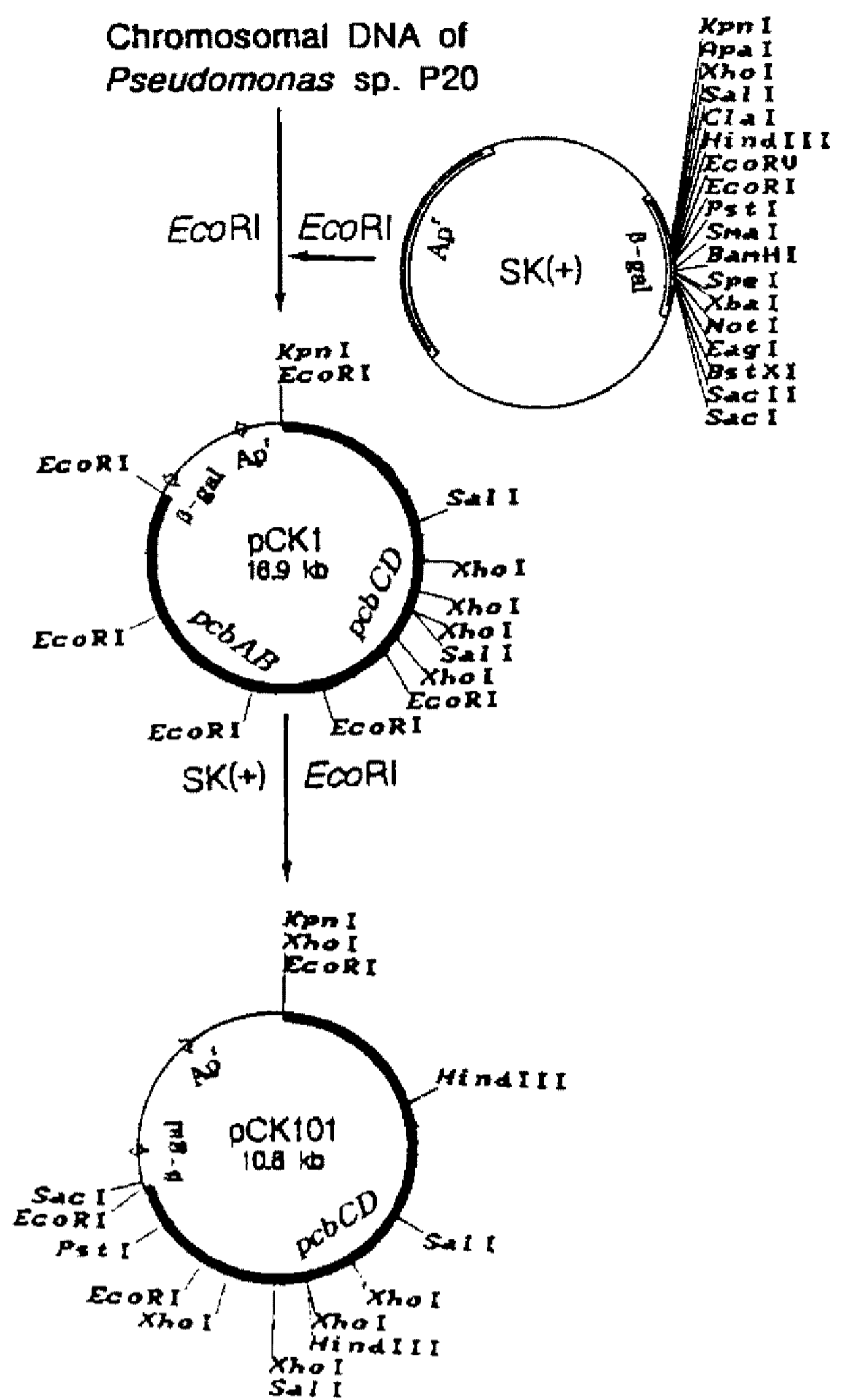


Fig. 1. Cloning scheme of the *pcb* genes.

유전자군을 cloning 하기 위하여 Fig. 1에서와 같이 *Pseudomonas* sp. P20의 total genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단하고 역시 동일한 제한효소로 절단한 pBluescript SK(+) vector와 3 : 1의 비율로 섞어 T4 DNA ligase을 첨가하여 16°C 에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 *E. coli* XL1-Blue에 Sambrook 등(15)의 방법에 따라 형질전환하였다. 분해유전자를 갖는 형질전환 집락의 선발방법은 ampicillin 100 µg/ml과 tetracycline 15 µg/ml이 포함된 LB(Luria-Bertani) 한천배지에 X-gal(20 mg/ml dimethylformamide에 녹임) 40 µl와 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG ; 200 mg/ml) 4 µl를 도말하고, 이 배지에 다시 상기 ligation 반응액을 도말하여 흰색을 띠는 균집락을 1차 선발하였다. 이와 같이 선발된 형질전환 균주에 0.1% 2,3-DHBP 용액을 분무하여 노란색의 MCP를 생성하는 균집락을 최종 선발하였다. 그리고 *pcbCD* 유전자를 subcloning 하기 위하여 선발된 재조합 plasmid를 *EcoRI*으로 절단하여 상기의 방법에

따라 pCK101을 제조하였다.

### Southern hybridization

*Pseudomonas* sp. P20로부터 제조한 재조합 plasmid인 pCK1의 14 kb의 *EcoRI* 절편을 사용하여 DNA probe를 만들었다. pCK1을 *EcoRI*으로 절단하여 0.7% agarose gel에서 전기영동하였다. 그 다음 agarose gel로부터 GENE CLEAN II Kit(BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA)에 의하여 주형 DNA의 절편을 분리 회수하였다. DNA probe의 labeling은 nick translation system과 biotin-14-dATP (BRL, Gaithersburg, MD., USA)을 이용하여 상품회사의 사용지침에 따라 표식하였다.

pCK1 DNA와 *Pseudomonas* sp. P20의 chromosomal DNA를 *EcoRI*으로 절단하여 1% agarose gel에 전기영동을 하였다. Gel은 Sambrook 등(15)과 Southern(16)의 방법을 원용하여 denaturation, neutralization 및 blot transferring을 실시하였으며, *pcbA-BCD*(14 kb *EcoRI* 절편)의 DNA probe를 포함하는 hybridization solution에서 42°C의 온도로 18시간 동안 hybridization을 실시하였다. 상동성의 DNA 절편은 BluGENE Nonradioactive Nucleic Acid Detection System(BRL, Gaithersburg, MD., USA)을 사용하여 확인하였다.

### 분해능의 검정

4CB의 분해능 검정과 그 산물인 2,3-dihydroxybiphenyl을 분해하는 2,3-DHBP dioxygenase의 활성을 측정하기 위하여 resting cell assay에 의한 UV spectrophotometry를 이용하였다. 분해유전자를 포함하는 재조합균주들을 LB 액체배지에서  $10^9$  cells/ml이 될 때까지 배양한 다음 원심분리하여 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척하고 MM2 배지에 4CB 또는 2,3-DHBP를 각각 1 mM과 2 mM이 되게 첨가하여 30°C 및 37°C에서 일정시간 동안 진탕배양하였다. 배양액을 채취하여  $10,000\times g$ 로 원심분리하여 4CB를 침전시킨 후 상층액을 취하여 2,3-DHBP는 235 nm에서, *meta*-cleavage compound는 434 nm에서 그리고 benzoate는 277 nm에서 UV-visible spectrophotometer로 scanning 하였다. 세포와 함께 침전 분리된 4CB는 ethanol에 녹인 후 다시  $10,000\times g$ 로 원심분리하여 세포를 제거시킨 후 상층액을 254 nm에서 scanning 하였다.

### 2,3-DHBP dioxygenase의 활성

*pcbC*(P20) 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxyge-

nase의 활성은 LB 액체배지에서 16시간 배양한 세포를 원심분리하여 수집한 다음 초음파처리하여 세포를 파쇄한 후  $25,000\times g$ 에서 10분간 원심분리한 상층액에서 측정하였다. 추출된 세포추출물에 2,3-DHBP을 기질로 첨가한 후 434 nm에서 HOPDA의 생성을 측정하므로써 *pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase의 활성을 측정하였다. 2,3-DHBP dioxygenase의 1 unit은 1분당 1  $\mu$ M의 MCP를 생성할 수 있는 효소의 양으로서 결정하였다. 단백질의 정량은 전보(17)에서 기술한 방법으로 측정하였고, 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA, Sigma Kit No. P 5656)을 사용하였다.

2,3-DHBP dioxygenase의 기질특이성은 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol을 기질로 하여 생성된 MCPs의 흡광도(catechol, 375 nm ; 3-methylcatechol, 388 nm ; 4-methylcatechol, 382 nm ; 4-chlorocatechol, 379 nm)를 측정함으로써 확인하였다(18).

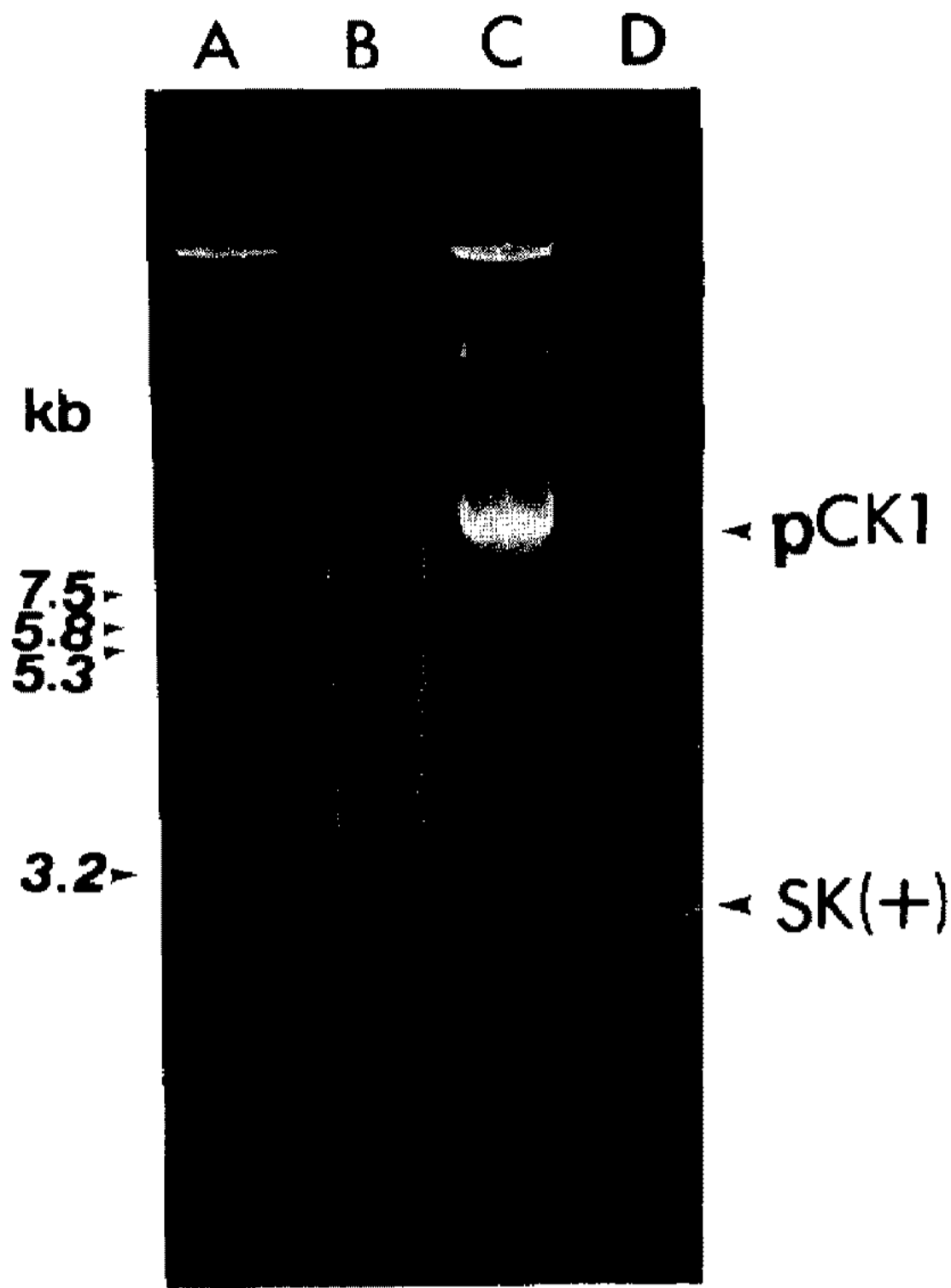
자연계 분리균주 및 재조합균주들의 성장에 따른 2,3-DHBP dioxygenase의 발현을 확인하기 위하여 *Pseudomonas* sp. P20과 *E. coli* CK1을 ampicillin(100  $\mu$ g/ml)이 함유된 LB 액체배지에 배양하여 각 시간 별로 균주의 성장곡선을 spectrophotometry에 의하여 작성하였고 배양액 1 ml을 취하여 상기의 방법으로 단백질을 정량하였으며, 1 mM의 2,3-DHBP을 반응시켜 효소의 비활성을 측정하였다.

## 결 과

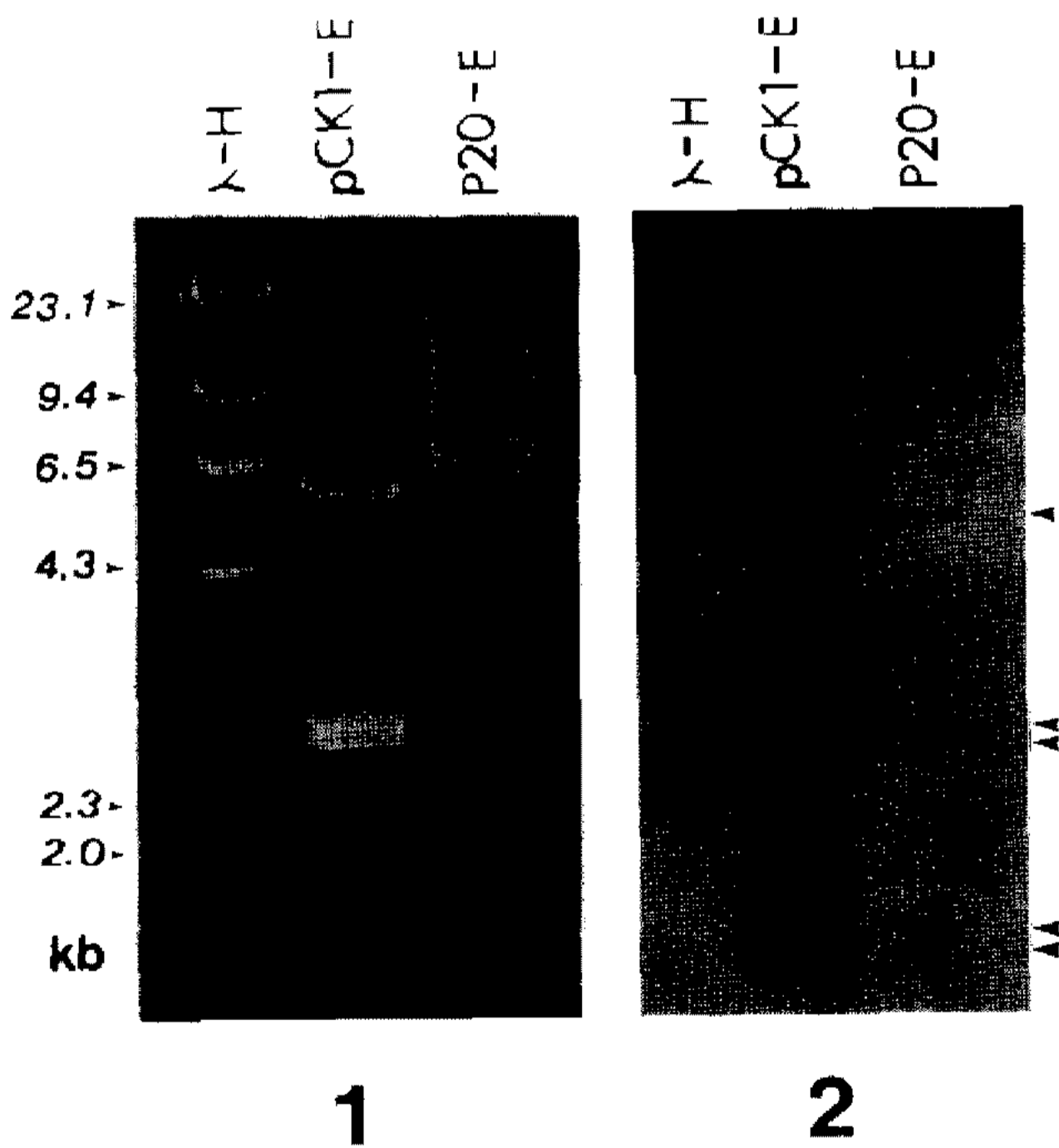
### 4CB 분해유전자군의 cloning

4CB 분해균주인 *Pseudomonas* sp. P20의 chromosomal DNA를 *EcoRI*으로 자르고 역시 *EcoRI*으로 자른 pBluescript SK(+) vector를 DNA ligation시켜 Fig. 1에서와 같이 *E. coli* XL1-Blue를 형질전환한 결과 약 1,400여개의 형질전환 균주들을 얻었다. 이 형질전환 균주들 중에서 1%(w/v)의 2,3-DHBP 용액을 분무하였을 때 황색의 MCPs가 생성되는 하나의 집락을 얻음으로서 이 균주에서 *pcbC*(P20) 유전자의 존재를 확인하였다. *pcbABCD* 유전자의 존재가 확인된 재조합균주가 가지고 있는 plasmid를 순수분리하여 agarose gel에서 전기영동하였을 때, Fig. 2에서와 같이 그 크기는 약 14 kb로 확인되었다. 이 재조합 plasmid를 pCK1이라 하고 이 재조합 균주를 *E. coli* CK1이라 명명하였다.

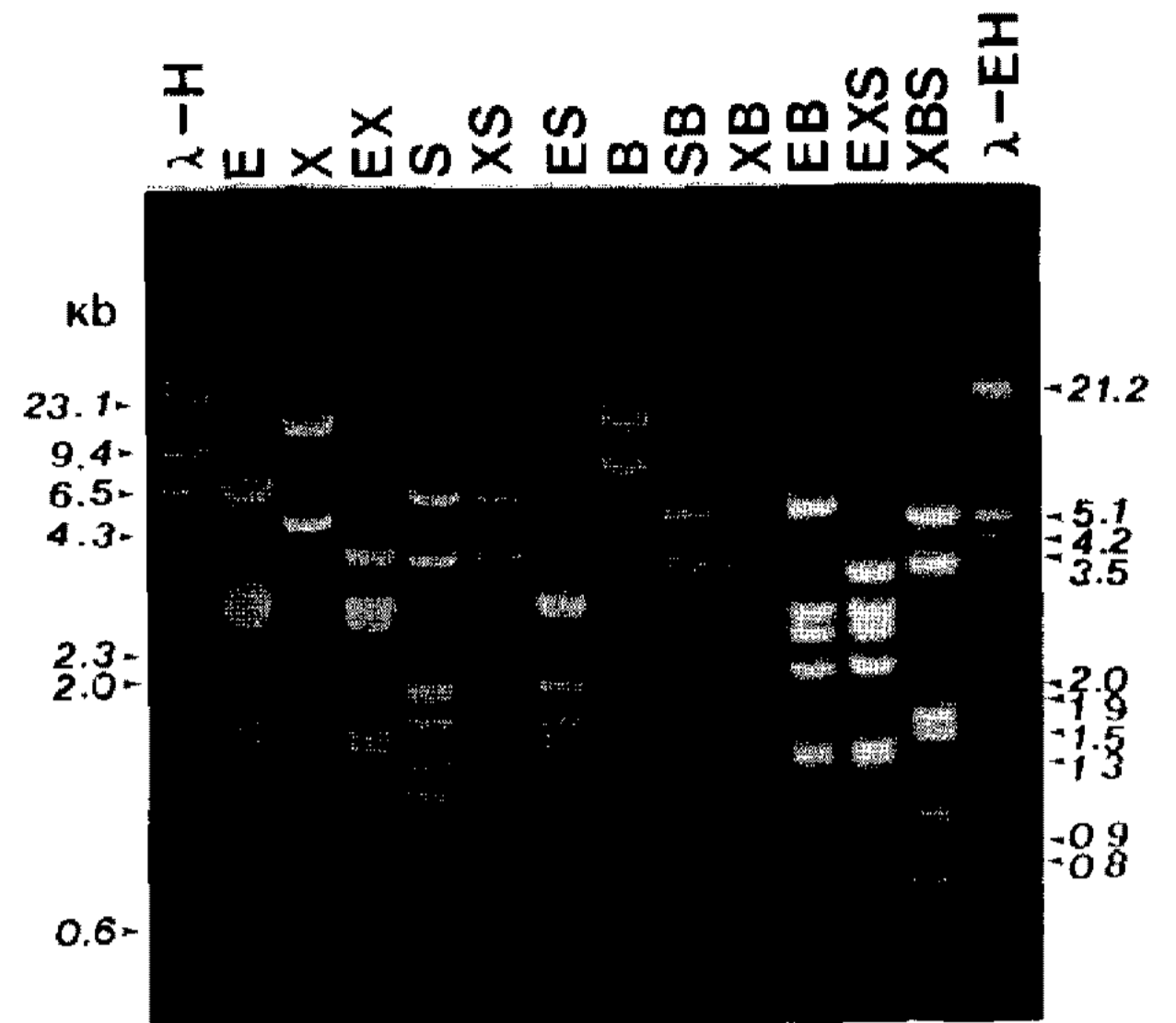
재조합 plasmid인 pCK1의 14 kb *EcoRI* 절편을 DNA probe로 사용하여 *Pseudomonas* sp. P20의 ch-



**Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pCK1.**  
Lane A, *E. coli* V517; B, chromosomal DNA of *Pseudomonas* sp. P20 digested with *EcoRI*; C, pCK1; D, pBluescript SK(+)



**Fig. 3. Agarose gel electrophoresis(1) of pCK1 and *EcoRI* fragments of *Pseudomonas* sp. P20. Southern blot hybridization(2) of the gel with *pcbABCD* fragments as a probe.**  
Arrows on the right show the hybridization signals(6.3, 2.8, 2.7, 1.5, and 1.45 kb in size). Abbreviation:  $\lambda$ -H,  $\lambda$ -*HindIII* size marker; E, *EcoRI*

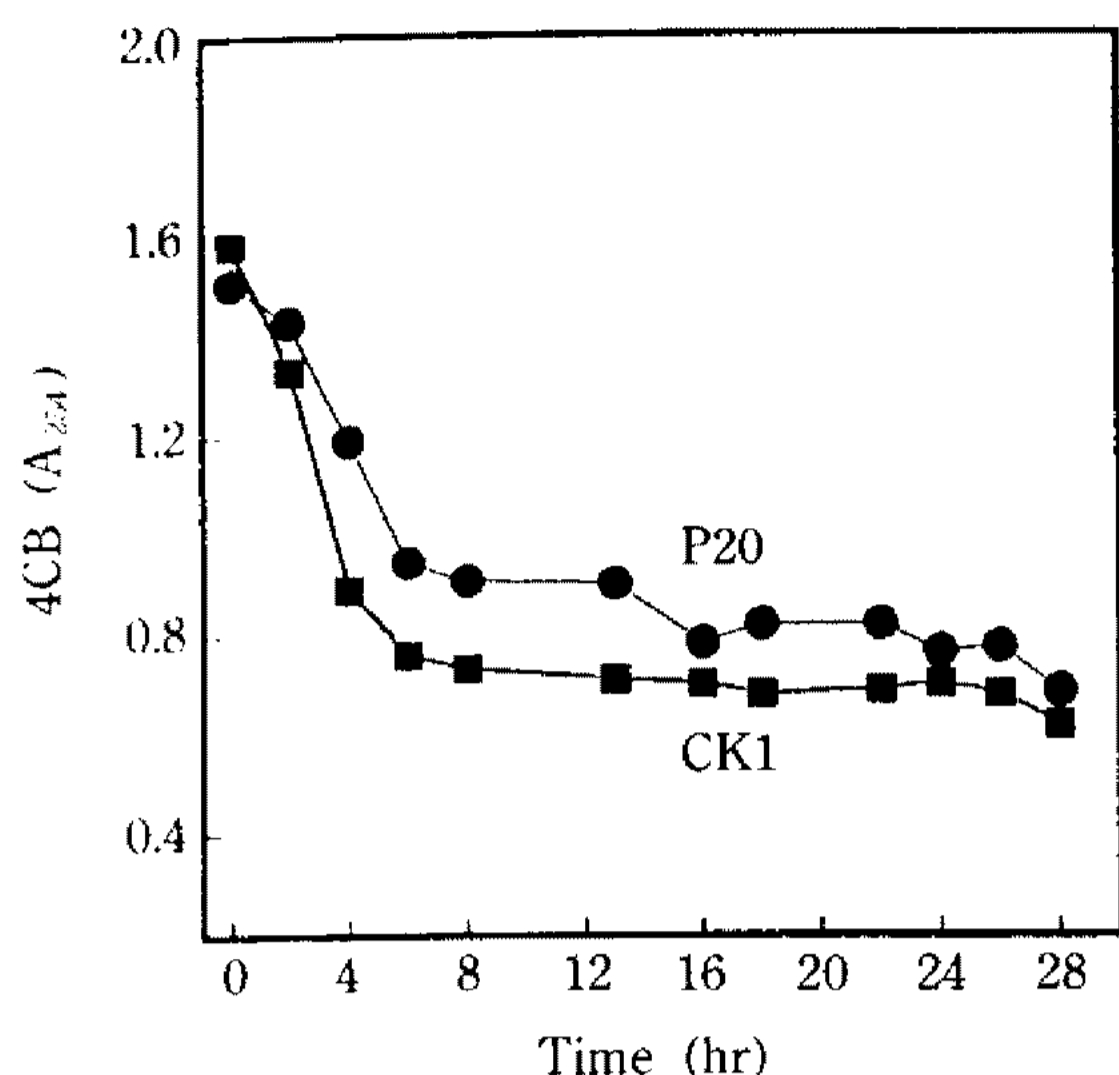


**Fig. 4. Restriction analysis of the recombinant plasmid pCK1.**  
Abbreviation:  $\lambda$ -H, -*HindIII* size marker; E, *EcoRI*; X, *XhoI*; S, *SalI*; B, *BstEII*; H, *HindIII*;  $\lambda$ -EH,  $\lambda$ -*EcoRI*-*HindIII* size marker

romosomal DNA와 Southern hybridization을 실시 하였을 때, Fig. 3(II)에서와 같이 *Pseudomonas* sp. P20의 chromosomal DNA에서 pCK1을 *EcoRI*으로 자른 5개의 절편과 동일한 위치에서 signal이 나타났다. 그리고 재조합 plasmid pCK1을 다양한 제한 효소로 절단한 후, Fig. 4와 같이 agarose gel에 전기 영동하여 나타난 절편의 수와 크기를 분석하여 Fig. 1에서와 같은 이 *pcbABCD*(P20) 유전자군의 제한효소 지도를 작성하였다.

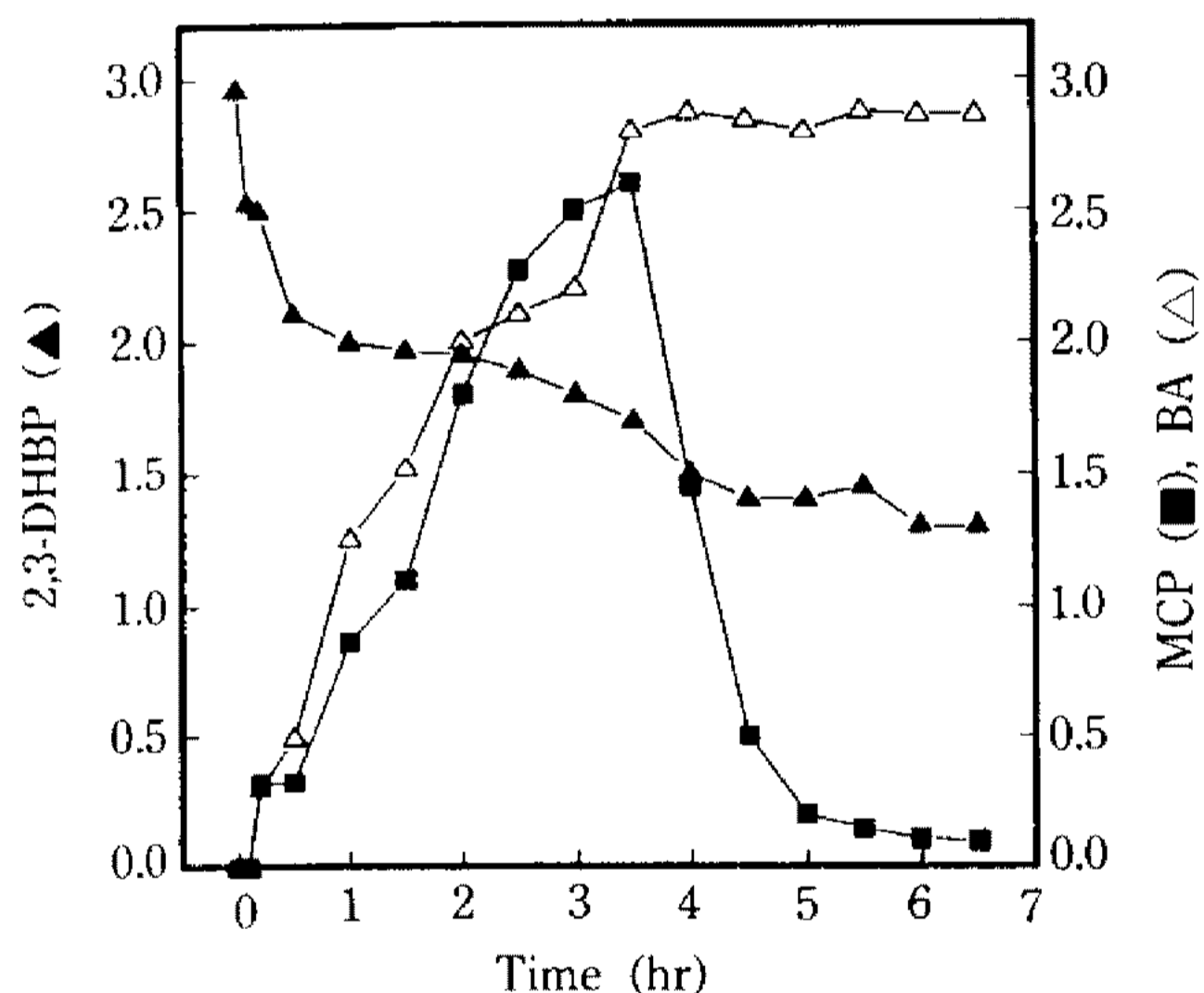
**4CB 분해유전자군의 *E. coli*에서의 발현**

재조합 plasmid pCK1의 4CB 분해유전자가 *E. coli* 균주에 형질전환되어 발현되는 지를 파악하기 위하여 *E. coli* CK1에 대하여 1 mM의 4CB 또는 2 mM의 2,3-DHBP를 기질로 사용하여 resting cell assay를 실시하였다. 그리고 4CB 감소를 UV-spectrophotometry로 측정된 결과는 Fig. 5에서와 같이 배양 후 3시간에서부터 *Pseudomonas* sp. DJ-12보다 더 큰 감소 경향을 나타냈다. 2,3-DHBP을 기질로 한 경우 Fig. 6에서처럼 배양 초기부터 2,3-DHBP의 감소와 더불어 배양액이 황색을 띄면서 HOPDA(*meta*-cleavage compound)가 생성되었다. 또 생성된 *meta*-cleavage compound는 시간이 지남에 따라 감소하면서 benzoate가 생성되어 배지내에 축적되었으며 다른 분해산물들은 측정되지 않았다. 이러한 결과에 의하여 재조합균주인 *E. coli* CK1은 4CB 분해유전자군인 *pcbABCD*(P20)를 모두 가지고 있는 것으로 판단된다.



**Fig. 5. Degradation of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas* sp. P20 and *E. coli* CK1.**

The resting cell assay was conducted in 10 mM phosphate buffer containing 1 mM 4CB, respectively. Abbreviation: 4CB, 4-chlorobiphenyl



**Fig. 6. Degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl by *E. coli* CK1.**

The resting cell assay was conducted in 10 mM phosphate buffer containing 2 mM 2,3-DHBP, respectively. Abbreviation: 2,3-DHBP, 2,3-dihydroxybiphenyl; HO-PDA, 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorobiphenyl) hexa-2,4-dienoate (meta-cleavage compound); BA, benzoic acid

#### *pcbC* 유전자의 발현

*Pseudomonas* sp. P20과 재조합균주인 *E. coli* CK1의 세포추출물을 추출한 후 2,3-DHBP을 기질로 반응시켜 2,3-DHBP dioxygenase의 비활성을 측정하였을 때, Table 1에서와 같이 *E. coli* CK1에서는 *Pseudomonas* sp. P20에 비하여 *pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase의 발현이 약 2배 이상을 나타내

**Table 1. Expression of *pcbC* gene in *Pseudomonas* sp. P20 and *E. coli* CK1**

Bacterial strains	Specific activity of 2,3-DHBP dioxygenase
<i>Pseudomonas</i> sp. P20	69
<i>E. coli</i> CK1	120
<i>E. coli</i> XL1-Blue	0

One unit of enzyme was defined as the amount producing 1  $\mu$ M of MCPs per min at 25°C. Specific activity of 2,3-DHBP dioxygenase was defined as the unit per mg of proteins.

**Table 2. Substrate profile of 2,3-DHBP dioxygenase of *E. coli* CK1**

Substrate	2,3-DHBP dioxygenase	
	Specific activity	Relative activity (%)
2,3-DHBP	120	100
Catechol	31	26
3-methylcatechol	38	31
4-methylcatechol	0	0
4-chlorocatechol	0	0

One unit of enzyme was defined as the amount producing 1  $\mu$ M of MCPs per min at 25°C. Specific activity was defined as the unit per microgram of protein.

었다. 이 효소는 Table 2에서와 같이 catechol과 3-methylcatechol과 같은 기질에 대해서도 2,3-DHBP에 비해 26~31%의 활성을 나타내었으나, 4-methylcatechol과 4-chlorocatechol에는 활성을 보이지 않았다.

*Pseudomonas* sp. P20과 *E. coli* CK1에서 2,3-DHBP dioxygenase의 발현을 생장곡선에 따라 측정된 결과는 Fig. 7에서와 같이 성장 초기에는 *pcbC* 유전자의 발현이 거의 일어나지 않았으나 지수성장 말기에 도달하면서 2,3-DHBP dioxygenase의 활성이 증가하였으며, 그 후에는 현저하게 감소하였다.

#### 고찰

본 연구에서 사용한 *Pseudomonas* sp. P20은 4CB를 분해하여 4CBA를 생성하는 단계까지는 *Pseudomonas* sp. DJ-12(7)와 같이 동일한 분해경로를 나타내지만, 4CBA를 축적한다는 점에서 큰 차이가 있다. 따라서 이러한 차이는 이 균주들이 가지고 있는 4CB의 분해특성과 분해유전자들 사이에 진화적 유연관계가 있다고 생각할 수 있다. *Pseudomonas* sp. P20의 4CB 분해유전자군도 현재까지 알려진 다른 *Pseudomonas*

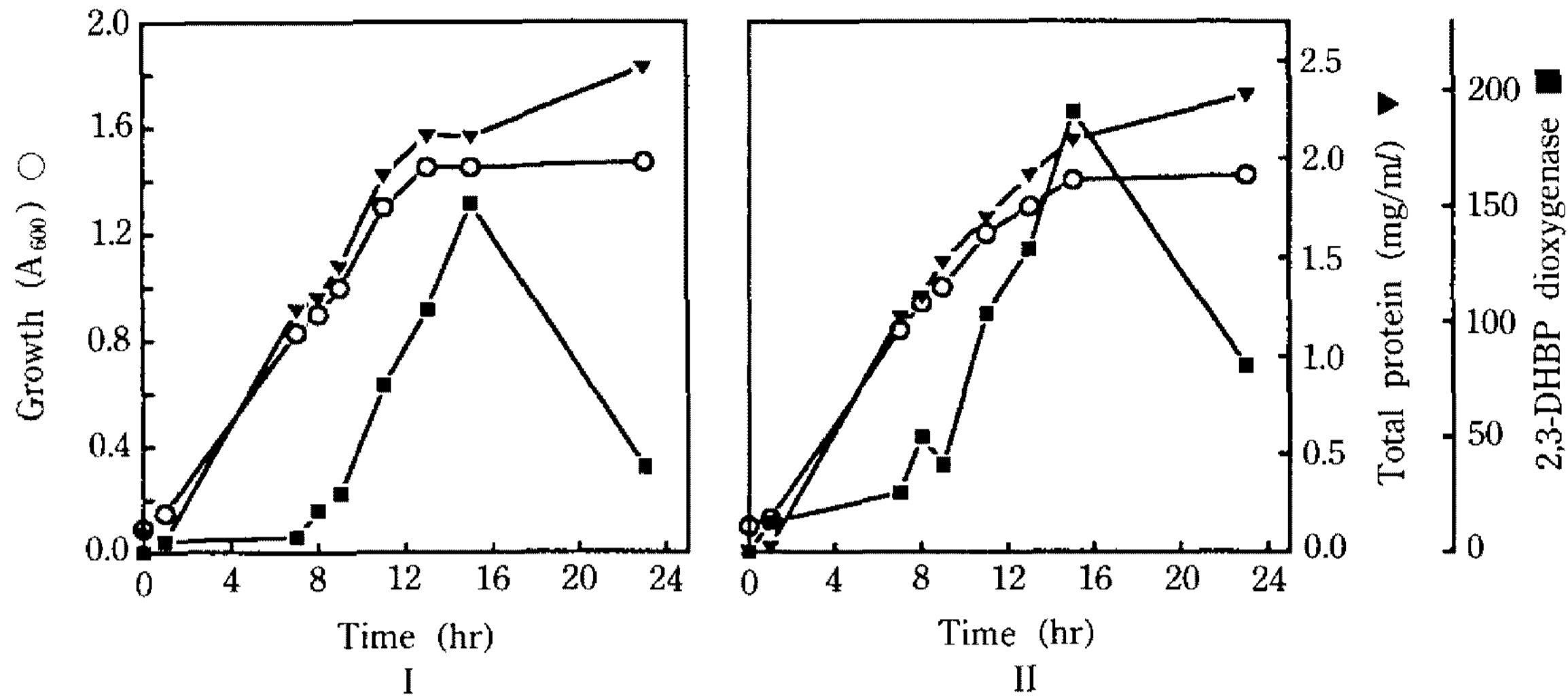


Fig. 7. Expression of *pcbC* gene and growth of *Pseudomonas* sp. P20 (I) and *E. coli* CK1 (II).

One unit of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase activity was defined as the amount producing 1  $\mu$ M of MCPs per min at 25°C. The *meta*-cleavage product expressed by *pcbC* was measured at 434 nm.

균종의 4CB 분해유전자군(6, 12, 19)과 같이 chromosomal DNA로부터 얻어졌다. 그러나 Layton 등(11)은 *Alcaligenes* sp. A5의 pSS50 plasmid에서 4CB 분해 유전자군을 클로닝하였다.

현재까지 알려진 4CB 분해유전자군들, 즉 Khan 등(9)에 의해 *P. putida*로부터 클로닝된 *cbpADCB*와 Furukawa 등(6)의 *P. pseudoalcaligenes* KF707과 Hayase 등(8)의 *P. pseudoalcaligenes* KF715에서 얻어진 *bphABCD* 그리고 Han 등(7)의 *pcbABCD*(DJ-12) 등이 모두 하나의 operon으로 구성되어 있다. *Pseudomonas* sp. P20의 4CB 분해유전자군도 하나의 operon으로 이루어져 있다고 판단된다. 재조합균주 *E. coli* CK1에서 *pcbC*(P20) 유전자의 발현은 자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. P20에 비하여 약 2배 정도 증가되었다. 이러한 결과는 *E. coli*의 multicopy plasmid vector인 pBluescript SK(+)<sup>1</sup>의 copy number에 기인하는 것으로 생각된다. 그러므로 *Pseudomonas* sp. P20의 *pcbC* 유전자는 DJ-12의 경우(14)에서 보다 효소의 비활성이 높기 때문에 유전자의 발현이 우수한 유전자원으로서 가치 있을 것으로 생각된다.

*E. coli* CK1에서 2,3-DHBP dioxygenase는 2,3-DHBP을 비롯하여 catechol과 3-methylcatechol 등의 기질에 대해서도 활성을 가지고 있었다. 이러한 결과는 Sung 등(17)이 지적한 바와 같이 4CB 분해특성이 서로 다른 균주군에 속하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 2,3-DHBP dioxygenase와 거의 유사한 기질 특이성을 보여주었으나 *P. putida* OU83(19)과 *P. pseudoalcaligenes* KF707(18)들과는 아주 상이함을 나타내고 있다. 또 *E. coli* CK1에서 *pcbC* 유전자의

발현은 *Pseudomonas* sp. P20에서 보다 훨씬 우수하였으며, 두 균주 모두 지수성장 말기에 발현이 가장 높았다.

본 실험을 통하여 *Pseudomonas* sp. P20이 가지고 있는 4CB를 분해하는 *pcb* 유전자군은 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 4CB 분해유전자군에 비하여 *E. coli*에서의 발현이 상당히 우수할 뿐 아니라, hybridization 실험 결과 염기서열에 있어서 상이한 특성(14)을 나타내었다. 그러므로 4CB를 분해하는 *Pseudomonas* sp. P20의 *pcbABCD* 유전자군은 자연계에서 4CB 분해 세균의 탐색 및 분해유전자의 전이 동태에 대한 분자생태학적 연구를 수행하는데 유용할 뿐더러, PCBs의 분해 제거를 위한 균주개발에 필요한 유전정보라고 판단된다.

## 요 약

*Pseudomonas* sp. P20은 난분해성 방향족 탄화수소 중의 한가지인 4-chlorobiphenyl(4CB)을 *meta*-cleavage를 거쳐 4-chlorobenzoic acid로 분해하는 세균이다. 이 세균의 chromosomal DNA로부터 14 kb의 *EcoRI* 절편을 pBluescript SK(+)<sup>1</sup> vector를 이용하여 *E. coli* XL1-Blue에 클로닝하여 4CB 분해유전자를 포함하는 재조합 plasmid인 pCK1과 재조합균주인 *E. coli* CK1을 얻었다. *E. coli* CK1은 *pcbAB* 산물에 의하여 4CB를 분해하고 또 *pcbCD* 산물에 의하여 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP)을 분해하여 *meta*-cleavage compound(MCP)와 benzoate를 생성하는 것을 resting cell assay에 의하여 확인하였다. *pcbC*의 발

현은 *Pseudomonas* sp. P20과 재조합균주인 *E. coli* CK1에서 모두 지수말기에 가장 잘 되었으며, *E. coli* CK1에서 *pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase 활성은 *Pseudomonas* sp. P20에 비하여 2배 이상 높았다. 또 2,3-DHBP dioxygenase는 catechol과 3-methylcatechol을 기질로 했을 때 2,3-DHBP에 비하여 26~31%의 활성을 나타내었으며, 4-methylcatechol과 4-chlorocatechol에 대해서는 활성이 없었다.

### 감사의 말

본 연구는 서울대학교 분자미생물학 연구센터 연구비의 지원으로 수행되었으며, 일부는 환경처의 선도기술 개발사업의 일환으로 이루어졌음.

### 참고문헌

- 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.
- Andreyeva, A.L., A.S. Slepenskyn, and I.I. Starovoytov. 1993. Increased expression of the plasmid-determined 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene in strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 211-216.
- 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.
- 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(*tol* operon). *J. Bacteriol.* **175**: 5224-5232.
- 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.
- Furukawa, K., and T. Miyazaki. 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kim, C.K., T.K. Sung, J.H. Nam, Y.C. Kim, and J.K. Lee. 1994. Cloning and expression of *pcbCD* genes in *Escherichia coli* from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Microbiol.* **32**: 40-46.
- Layton, A.C., J. Sanseverino, W. Wallace, C. Corcoran, and G.S. Sayler. 1992. Evidence for 4-chlorobenzoic acid dehalogenation mediated by plasmids related to pSS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 399-402.
- Mondelo, F.J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* **171**: 1725-1732.
- Nam, J.H. 1994. Cloning and expression of 4-chlorobiphenyl degrading *pcb* genes in *Pseudomonas* sp. P20. M.S. thesis, Chungbuk National University.
- Nam, J.H., C.K. Kim, J.K. Lee, and K.J. Lee. 1994. Homology analysis among the biphenyl and 4-chlorobiphenyl degrading genes by Southern hybridization. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 37-44.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific segments among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- 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. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 150-156.
- 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. *Biochemistry* **27**: 3990-3996.
- 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.
- 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 May 10, 1994)