

## pKT230 벡터를 이용한 *Pseudomonas* sp. P20의 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase 유전자의 클로닝

김지영 · 김치경\* · 가종억<sup>1</sup> · 민경희<sup>1</sup> · 박용근<sup>1</sup>

충북대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>서울대학교 분자미생물학연구센터

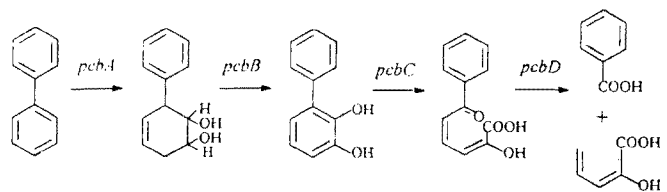
**Cloning of 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase Gene from *Pseudomonas* sp. P20 using pKT230 Vector.** Ji-Young Kim, Chi-Kyung Kim\*, Jong-Ok Ka<sup>1</sup>, Kyung-Hee Min<sup>1</sup> and Yong-Keun Park<sup>1</sup>. Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, <sup>1</sup>Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea — *Pseudomonas* sp. P20 isolated from the polluted environment is capable of degrading biphenyl and 4-chlorobiphenyl. The *pcbABCD* genes responsible for degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl were cloned using pBluescript SK(+) from the chromosomal DNA of *Pseudomonas* sp. P20 to construct pCK1 and pCK102, harbouring *pcbABCD* and *pcbCD*, respectively. The 2,3-DHBP dioxygenase gene, *pcbC*, was cloned again from pCK102 by using pKT230 which is known as a shuttle vector and pKK1 hybrid plasmid was constructed. The *E. coli* KK1 transformant obtained by transforming the pKK1 into *E. coli* XL1-Blue showed 2,3-DHBP dioxygenase activity. The specific 2,3-DHBP dioxygenase activity of *E. coli* KK1 was similar to that of the *E. coli* CK102, but much higher than those of the natural isolates, *Pseudomonas* sp. DJ-12 and *Pseudomonas* sp. P20.

Polychlorinated biphenyls(PCBs)는 화학 그리고 열역학적으로 안정하기 때문에 각종 산업제품의 용제로 지난 수십년 동안 사용되어 왔다. 그러나 PCBs와 같은 xenobiotics는 사용효과적인 면들만 고려하여 제조 사용되었기 때문에, 생명체들의 기본 서식처인 토양이나 수질 환경에 오염될 때에는 분해되지 않고 축적되어 심각한 환경문제를 야기시키고 있다. 그러므로 오염된 자연계로부터 PCBs를 제거하기 위하여 미생물에 의한 분해 연구가 여러 각도에서 시도되어왔다(1-6). 그리고 이러한 물질을 에너지 및 탄소원으로 이용하는 세균들로부터 분해유전자군을 클로닝하여 우수한 재조합 균주를 제조하려는 연구(7-12), 각 유전자들의 염기서열을 분석하는 연구(13-16), 그리고 각각의 유전자에 의하여 생산되는 효소에 관한 연구(17,18) 등이 활발히 진행되고 있다.

Biphenyl 및 PCBs가 호기성 미생물에 의하여 분해되는 과정은 4단계의 반응에 의해 분해된다(Fig. 1)고 보고되어 있다(19). 즉, biphenyl dioxygenase(*pcbA* 산물), dihydrodiol dehydrogenase(*pcbB* 산물), 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) dioxygenase(*pcbC* 산물), 그리고 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) hydrolase(*pcbD* 산물)가 연속적으로 작용함으로써 분해가 이루어지는 것이다. 미생물에 의한 PCBs의 분해정도는 염소의 수가 많을 수록 그 분해 효과가 감소하고, biphenyl의 양쪽 벤젠 고리보다는

한쪽 벤젠 고리에만 염소가 치환된 경우에는 분해가 더 용이하며 염소가 치환되지 않은 벤젠 고리가 먼저 개환된다(19). 또, PCBs의 분해는 벤젠 고리를 개환하는 2,3-DHBP dioxygenase(2,3-DHBD)의 작용이 결정적인 영향을 준다(20,21). 이와 같이 벤젠 고리의 개환은 biphenyl이나 PCBs와 같은 방향족 탄화수소 화합물의 분해과정에 큰 비중을 차지하므로 *pcbABCD* 유전자군 가운데 *pcbC* 유전자에 대한 연구는 매우 중요하다.

Maeda 등(22)은 *Rhodococcus erythropolis* TA421의 chromosomal DNA에서 2,3-DHBD 유전자인 *bphC*를 분리한 후, pUC119 또는 pUC118 벡터에 삽입시켜 *E. coli* 균주에 형질전환시켰고, Nam 등(23)도 biphenyl과 4-chlorobiphenyl에 대한 분해능을 지닌 *Pseudomonas* sp. P20으로부터 *pcbC* 유전자를 pBluescript SK(+) 벡터를 이용하여 *E. coli* 균주에 클로닝하여 2,3-DHBD를 과대발현시켰다. 이에 비해 Kimbara 등(24)과 Dowling 등(11)은 2,3-DHBD 유전자인 *bphC*를 일반적인 벡터가



**Fig. 1. Microbial catabolism of biphenyl to form benzoate and 2-hydroxypenta-2,4-dienoate.**

The enzymes are biphenyl dioxygenase (*pcbA*), dihydrodiol dehydrogenase (*pcbB*), 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) dioxygenase (*pcbC*), and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate(HOPDA) hydrolase (*pcbD*).

\*Corresponding author.

**Key words:** 2,3-Dihydroxybiphenyl dioxygenase(2,3-DHBD), pKT230, Cloning and expression, *Pseudomonas* sp. P20.

아닌 broad-host-range cosmid 벡터를 이용하여 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas* sp. strain B13에 각각 클로닝하여 2,3-DHBD를 발현시켰다. Andreyeva 등(25)은 broad-host-range 벡터인 RSF1010에 *bphC* 유전자를 각각 *E. coli*, *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 클로닝한 결과, *E. coli*에 비해 *Pseudomonas putida*에서는 5.3배, 또 *Pseudomonas aeruginosa*에서는 9배의 높은 효소 활성을 나타냈다고 보고하였다.

그러므로 본 연구에서는 *Pseudomonas*의 클로닝 벡터로 개발된 RSF1010 벡터(26)에 kanamycin 내성 유전자를 삽입하여 변형시킨 pKT230 벡터(27)를 사용하여 biphenyl과 4-chlorobiphenyl의 분해균주로 자연계에서 분리한 *Pseudomonas* sp. P20의 염색체 DNA로부터 2,3-dihydroxybiphenyl의 벤젠 고리를 개환하는 *pcbC* 유전자를 클로닝하였다. 그리고 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 2,3-DHBP dioxygenase의 활성이 자연계 분리균주보다 우수한 균주를 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용한 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) 분해균주는 Youn 등(5)에 의해 청주 공단폐수로부터 분리한 biphenyl 및 4-chlorobiphenyl(4CB) 분해균주인 *Pseudomonas* sp. P20이었다. 또 본 연구실에서 제조된 biphenyl의 분해유전자인 *pcbABCD*의 재조합균주인 *E. coli* CK1과 *E. coli* CK102도 사용하였다(23). *E. coli* XL1-Blue를 형질전환 host 균주로 사용하였고, broad host range plasmid인 pKT230을 클로닝 벡터로 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주 및 플라스미드들의 특성은 Table 1과 같다.

### 배지 및 배양

자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. P20의 증식에는 Kiyohara 등(28)의 보고에서와 같이 MM2 최소배지를 사용하였으며, 단일 탄소원으로 1 mM의 biphenyl 또는 4CB를 첨가하여 30°C에서 배양하였다. 실험실 재조합균주인 *E. coli* CK1과 *E. coli* CK102는 ampicillin(100 µg/ml)을 첨가한 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone, 10 g/l; Bacto yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l, pH 7.0)에서 배양하였다. *E. coli* KK1의 배양은 30 µg/ml의 kanamycin을 첨가한 LB 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였고, 고체배지의 경우에는 한천을 1.5%로 첨가하였다.

### 시약 및 제한효소

단일 탄소원으로 첨가한 biphenyl과 4CB는 동경화성(Tokyo, Japan), 2,3-DHBP는 Wako Chemical Ind., Ltd. (Osaka, Japan)으로부터 구입하였다. T4 DNA ligase, *SalI*, *SacI*, *EcoRI*, *HindIII*와 *PstI* 등의 제한효소는 한국제철 화학(KOSCO, Korea)의 제품을 사용하였다. Agarose gel에서 플라스미드 DNA를 분리할 때에는 Gene Clean kit(Bio 101 Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

### 플라스미드 DNA의 분리 및 전기영동

플라스미드 DNA는 Sambrook 등(29)의 alkaline lysis 방법으로 분리한 다음 ammonium acetate-isopropanol을 이용하여 DNA를 침전 정제하였다. DNA의 전기영동은 horizontal electrophoresis system을 이용하여 0.7~1.0%의 agarose gel에서 실시하였다. 전기영동에는 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) 또는 TBE buffer(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하여 5 V/cm 이하로 전개시켰다. 전기영동 후 gel은 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 용액에서 40분간 염색한 후 UV-transilluminator(305 nm)로 관찰하였고, UV

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

Strains and plasmids	Relevant markers	Sources
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	BP <sup>r</sup> , 4CB <sup>r</sup> , 4CBA <sup>r</sup> , 2,4-DCBP <sup>r</sup>	(5)
<i>Pseudomonas</i> sp. P20	BP <sup>r</sup> , 4CB <sup>r</sup> , 4CBA <sup>r</sup> , 2,4-DCBP <sup>r</sup>	(24)
<i>E. coli</i> CK1	BP <sup>r</sup> , 4CB <sup>r</sup> , 2,3-DHBP <sup>r</sup>	(23)
<i>E. coli</i> CK102	2,3-DHBP <sup>r</sup>	(23)
<i>E. coli</i> KK1	2,3-DHBP <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Host strain	Stratagene Ltd.
Plasmids		
pCK102	<i>pcbCD</i> , Ap <sup>r</sup> , subclone containing 6.3 kb <i>EcoRI</i> fragment of pCK1	(23)
pKK1	<i>pcbC</i> , 1.95 kb <i>EcoRI</i> fragment of pCK102/SK(+), Km <sup>r</sup>	This study
pKT230	Cloning vector, Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Mob <sup>r</sup>	(26)

Abbreviation: 4CB, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; 2,4-DCBP, 2,4-dichlorobiphenyl; 2,3-DHBP, 2,3-dihydroxybiphenyl; Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Sm<sup>r</sup>, streptomycin resistance; Mob<sup>r</sup>, *mob* gene.

DNA SLII camera system(Seolin, Korea)을 이용하여 사진촬영하였다.

### 2,3-DHBD 유전자의 클로닝

2,3-DHBP dioxygenase(2,3-DHBD)를 암호화하는 *pcbC* 유전자를 pKT230 벡터에 클로닝하기 위하여 Fig. 2에서와 같이 제조된 pCK102를 *EcoRI*-*XbaI*으로 절단하고 pBluescript SK(+)도 동일하게 절단한 후 ligation하여 hybrid plasmid를 제조하였다. 이 plasmid를 다시 *EcoRI*으로 절단하고, 동일한 제한효소로 절단한 pKT230 벡터와 3:1의 비율로 섞은 후 T4 DNA ligase를 첨가하여 15°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료를 Sambrook 등(29)의 방법에 따라 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켰다. 2,3-DHBD 유전자를 갖는

형질전환체는 30 µg/ml의 kanamycin이 포함된 LB 한천배지에 ligation 반응액을 도말하여 나타나는 균집락을 1차 선발한 후, 0.1%의 2,3-DHBP 용액을 분무하여 노란색의 HOPDA를 생성하는 균집락을 2차로 선발하였다.

### 2,3-DHBD의 효소 활성 측정

**Resting cell assay** 2,3-DHBD 유전자가 재조합된 *E. coli* KK1의 2,3-DHBD 활성은 resting cell assay 방법으로 측정하였다. 재조합균주인 *E. coli* KK1을 LB 액체배지에서 10<sup>8</sup> cells/ml이 될 때까지 배양한 다음 원심분리하여 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척한 균체에 2,3-DHBP를 2 mM이 되게 첨가한 MM2 배지를 혼합하여 37°C에서 일정시간 동안 진탕하였다. 균체혼합액 1 ml을 채취하여 10,000×g로 원심분리한 후, 상층액을 취하여 UV-visible spectrophotometer로 scanning하여 2,3-DHBP는 235 nm에서, HOPDA는 434 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Growing cell assay** 재조합 균주 *E. coli* KK1의 배양액으로부터 2,3-DHBD의 효소 활성을 측정하기 위하여 1 mM의 2,3-DHBP와 1%의 glucose가 포함된 MM2 액체배지에서 37°C로 배양하였다. 일정 시간에 따라 배양액 1 ml을 취하여 상기한 spectrophotometry 방법으로 균주의 생장은 600 nm에서 그리고 HOPDA의 생성은 434 nm에서 측정하였다.

**Crude enzyme assay** 자연계 분리 균주와 재조합 균주의 2,3-DHBD 활성은 LB 액체배지에서 16시간 배양한 균체를 원심분리하여 수집한 후, Bollag 등(30)의 방법에 따라 초음파파쇄기(Fisher M-300)로 세포를 파쇄한 후, 25,000×g에서 10분간 원심분리한 상층액을 취하여 효소액으로 사용하였다. 효소액에 2,3-DHBP를 첨가하여 반응시킴으로서 생성되는 HOPDA의 양으로 2,3-DHBD의 활성을 측정하였다. 2,3-DHBD의 1 unit은 25°C에서 1분당 1 µM의 HOPDA를 생성할 수 있는 효소의 양으로서 결정하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등(31)의 방법으로 실시하였고, 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA, Sigma Kit No. P 5656)을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 2,3-DHBD 유전자의 클로닝

pCK102의 2,3-DHBP dioxygenase(2,3-DHBD) 유전자를 pBluescript SK(+)에 재조합시켜 만든 hybrid plasmid로부터 2,3-DHBD 유전자가 포함된 1.9 kb의 *EcoRI*-단편을 얻은 후, pKT230 벡터에 삽입시켜 13.8 kb의 pKK1 재조합플라스미드를 제조하였다. pKK1을 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 2,3-DHBD 유전자가 발현되는 재조합균주를 제조하여 *E. coli* KK1이라고

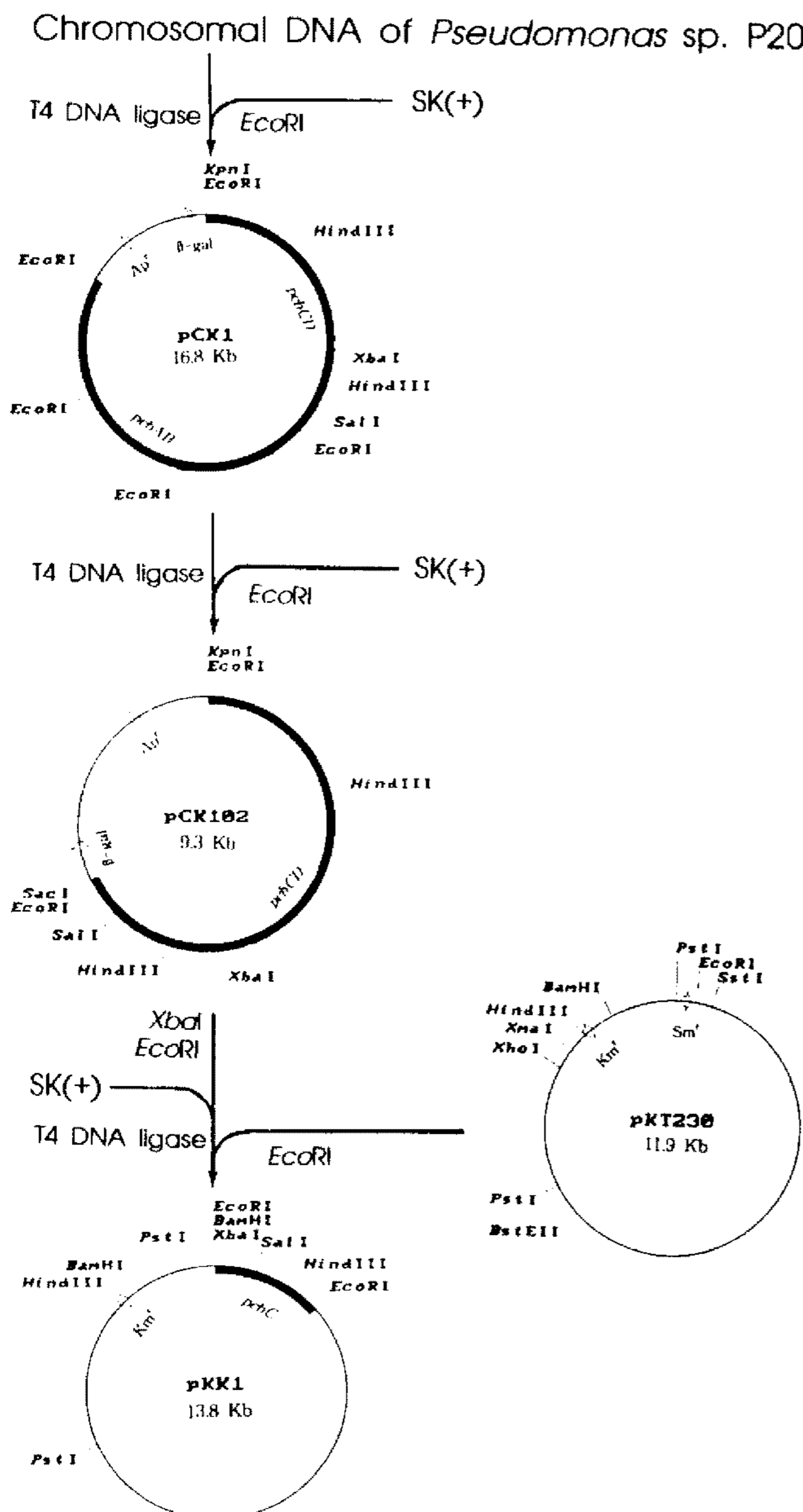


Fig. 2. Cloning scheme of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase(2,3-DHBD) gene from *Pseudomonas sp.* P20.

명명하였다. pKK1 재조합플라스미드를 제한효소로 절단한 후 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같다. 특히, pKT230 벡터에는 인식부위가 존재하지 않는 *SalI*과 *SacI* 제한효소, 또, 각각 1개의 제한효소 인식부위가 있는 *HindIII*와 *PstI*의 절단 결과를 분석하여 2,3-DHBD 유전자를 내포하는 1.9 kb(*EcoRI*-단편)의 삽입 DNA의 제한효소지도를 작성한 결과는 Fig. 4와 같다. *SalI*, *HindIII* 그리고 *PstI*의 인식부위는 각각 1개씩 존재하였고, *SacI*은 2개의 인식부위가 확인되었다. 이는 Maeda등(22)이 *Rhodococcus erythropolis*에서 얻은 2,3-DHBD 유전자에 존재하는 *SacI*, *SalI*, *HindIII*, 그리고 *PstI*의 제한효소 인식부위와 유사하였다. 또, *bphABCD* 유전자 군을 가지고 있는 *Pseudomonas* strain LB400(10)과 *Pseudomonas* strain KKS102(24)의 2,3-DHBD 유전자에서도 같은 종류의 제한효소 인식부위가 보고되었다. 이러한 결과들은 *pcb*의 유전자 중 2,3-DHBD를 암호하는 *pcbC* 유전자가 상이한 균주에서도 중요한 분해

기능을 하기 위하여 잘 보존되어 있음을 의미하는 것이다.

2,3-DHBD 유전자의 *E. coli*에서의 발현

재조합 균주 *E. coli* KK1에 클로닝된 2,3-DHBD 유전자의 발현을 확인하기 위하여 resting cell assay를 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. 2,3-DHBP는 배양 초기부터 100분 이내에 분해가 일어났으며, 이와 더불어 HOPDA가 생성되었다. 이와 같은 결과로 재조합 균주인 *E. coli* KK1의 2,3-DHBD 유전자는 정상적으로 발현됨을 확인하였다. 또 2,3-DHBD에 의하여 생성된 HOPDA는 더이상 분해되지 못하고 축적되는 결과는 *E. coli* KK1에 HOPDA를 분해하는 *pcbD* 유전자가 결여되어있음을 의미하는 것이다.

재조합 균주의 성장과 함께 따른 2,3-DHBD 유전자의

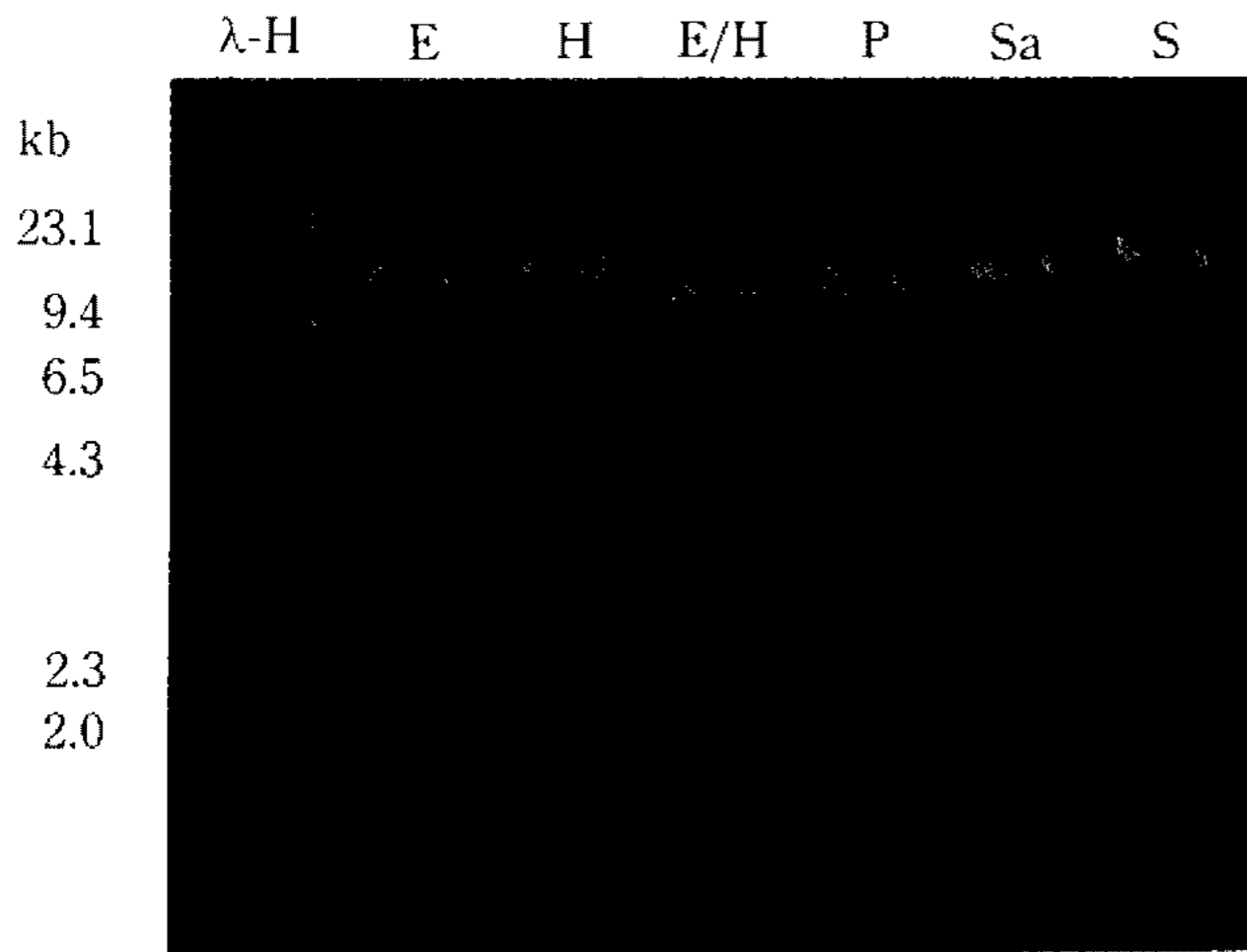


Fig. 3. The recombinant plasmid pKK1 and its fragments digested with various restriction endonucleases. Abbreviations: λ-H, λ-*HindIII* size marker; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; Sa, *SacI*; S, *SalI*.

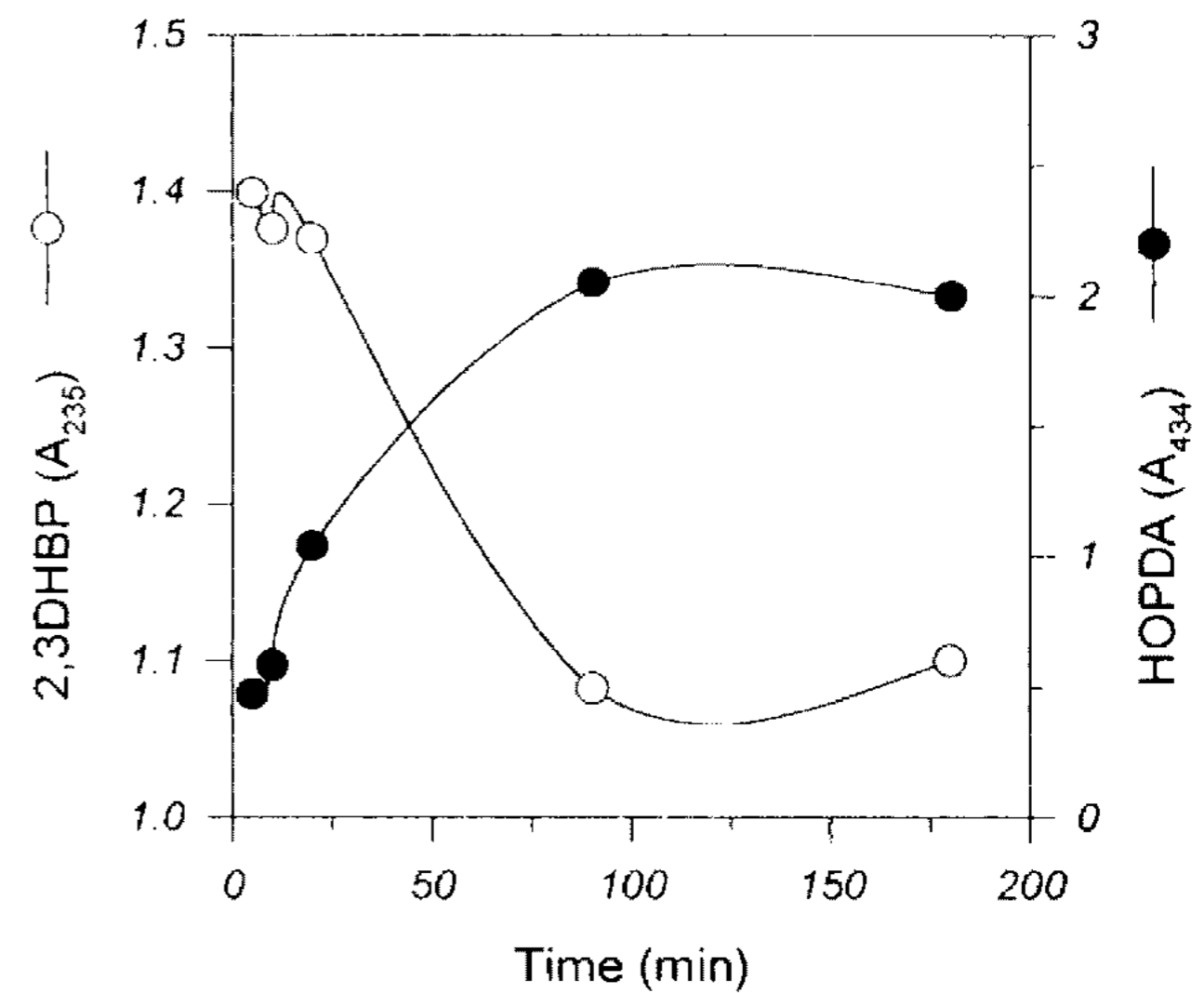


Fig. 5. Degradation of 2,3-DHBP and production of HOPDA by *E. coli* KK1 containing 2,3-DHBD gene by resting cell assay. The resting cell assay was conducted in 10 mM potassium phosphate buffer containing 2 mM 2,3-DHBP.

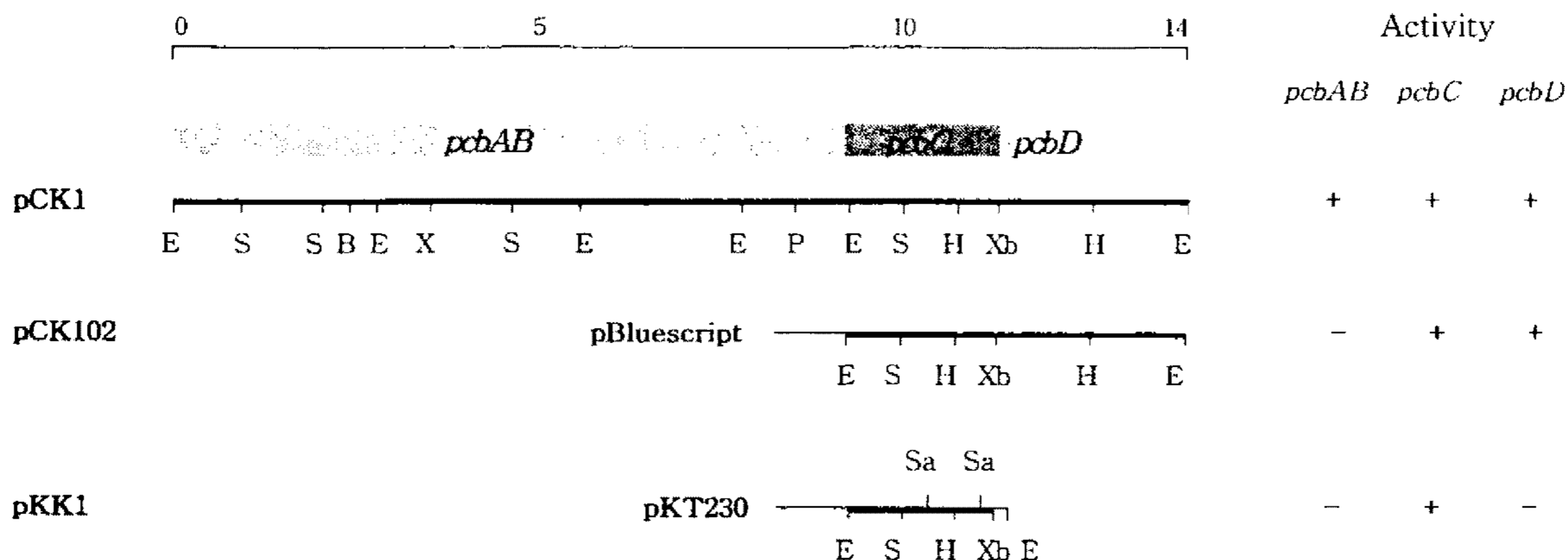


Fig. 4. Physical maps of the recombinant plasmids pKK1 containing 2,3-DHBD gene. Abbreviations: E, *EcoRI*; S, *SalI*; B, *BstEII*; X, *XhoI*; H, *HindIII*; Xb, *XbaI*; Sa, *SacI*; +, express; -, not express.

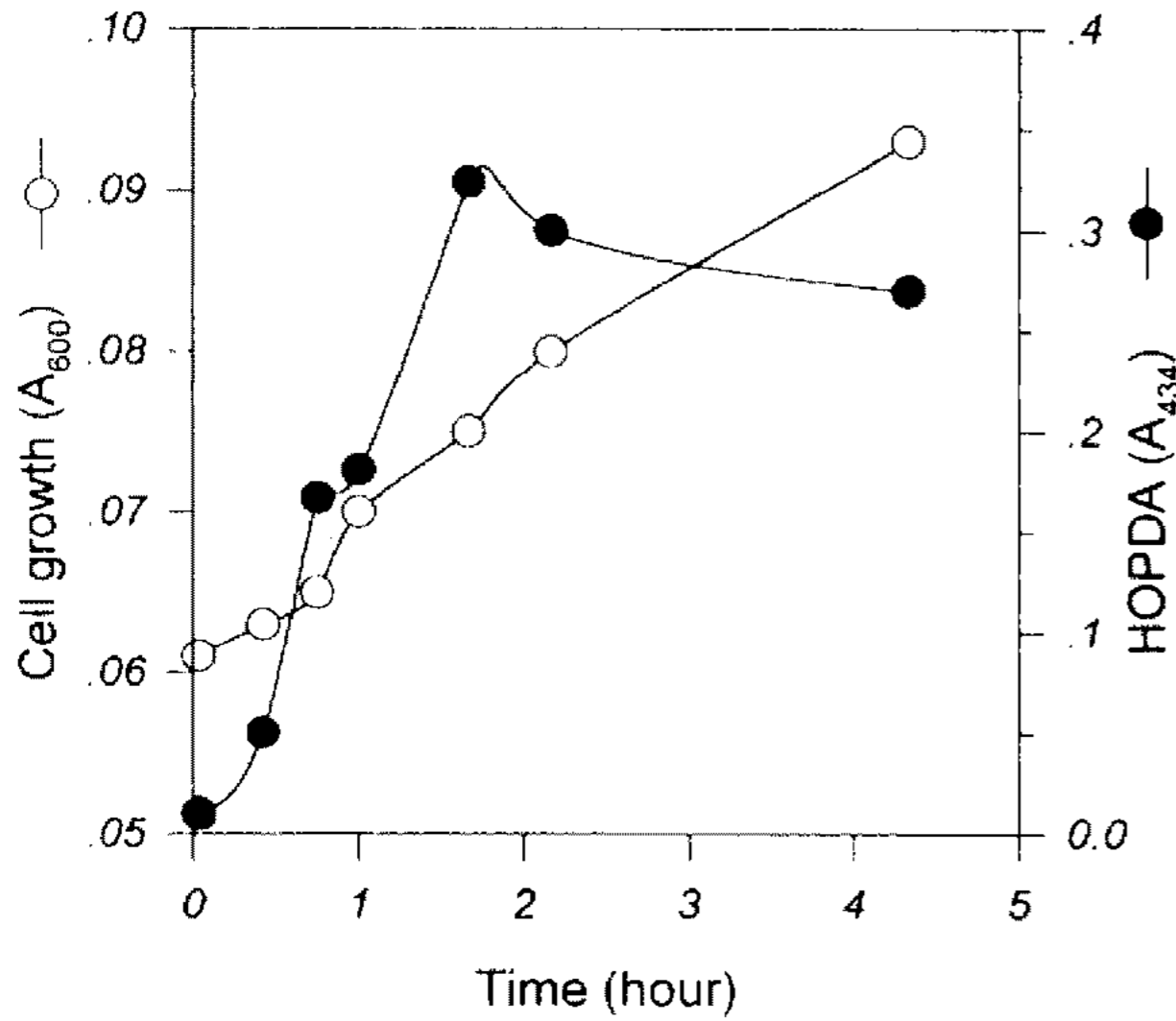


Fig. 6. Growth curve and production of HOPDA by *E. coli* KK1 in minimal medium added with 2,3-DHBP.

The growing cell assay was conducted in minimal medium with 1 mM 2,3-DHBP. Minimal medium is containing 1% glucose as sole carbon source and energy source.

발현을 growing cell assay 방법으로 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. MM2 용액배지에 탄소 및 에너지원으로 첨가한 2,3-DHBP로부터 동시에 생산되는 HOPDA는 *E. coli* KK1의 배양초기부터 검정되었다. 세균의 생장이 계속되는 동안 HOPDA의 생산은 2시간까지 급속도로 증가된 후 더이상 증가되지 않았다. 재조합 균주인 *E. coli* KK1이 가지고 있는 2,3-DHBD의 specific activity는 초음파파쇄기를 사용하여 얻은 100 µg/ml의 효소액에 2,3-DHBP를 첨가하여 반응시킴으로서 생성되는 HOPDA의 양을 측정하였다. 그 결과, Fig. 7에서와 같이 434 nm에서 측정되는 HOPDA는 반응 초기부터 검출되기 시작하여 10시간의 반응 후 최대량이 검정되었다.

본 실험에서 얻은 *E. coli* KK1 재조합균주의 2,3-DHBD 활성을 자연계 분리균주들과 비교한 결과는 Fig. 8과 같다. pKT230 벡터를 이용한 *E. coli* KK1의 2,3-DHBD 활성은 pBluescript SK(+)를 이용하여 제조한 *E. coli* CK102의 2,3-DHBD 활성과 비슷하였다. 그리고 자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 *Pseudomonas* sp. P20의 2,3-DHBD의 활성은 *E. coli* KK1에 비해 각각 약 2%와 16%로, 재조합 균주인 *E. coli* KK1에서 2,3-DHBD의 활성 즉 *pcbC* 유전자의 발현이 매우 활발하였다. 따라서 pKT230는 자연계 분리 균주로부터 벤젠 고리의 개환에 관여하는 2,3-DHBD 유전자를 클로닝하여 분해 효과를 증진시키는데 적합한 벡터라고 판단된다. Kimbara 등(24)은 PCBs를 분해할 수 있는 자연계 분리균주인 *Pseudomonas* sp. KKS102의 *bphA-BCD* 유전자를 broad-host-range cosmid 벡터인 pCP13을 이용하여 pKS13를 제조하였다. pKS13의 *bphCD* 유전자를 *E. coli*와 *Pseudomonas putida*에 형질전환시킨 결과, *Pseudomonas putida*에서만 2,3-DHBD가

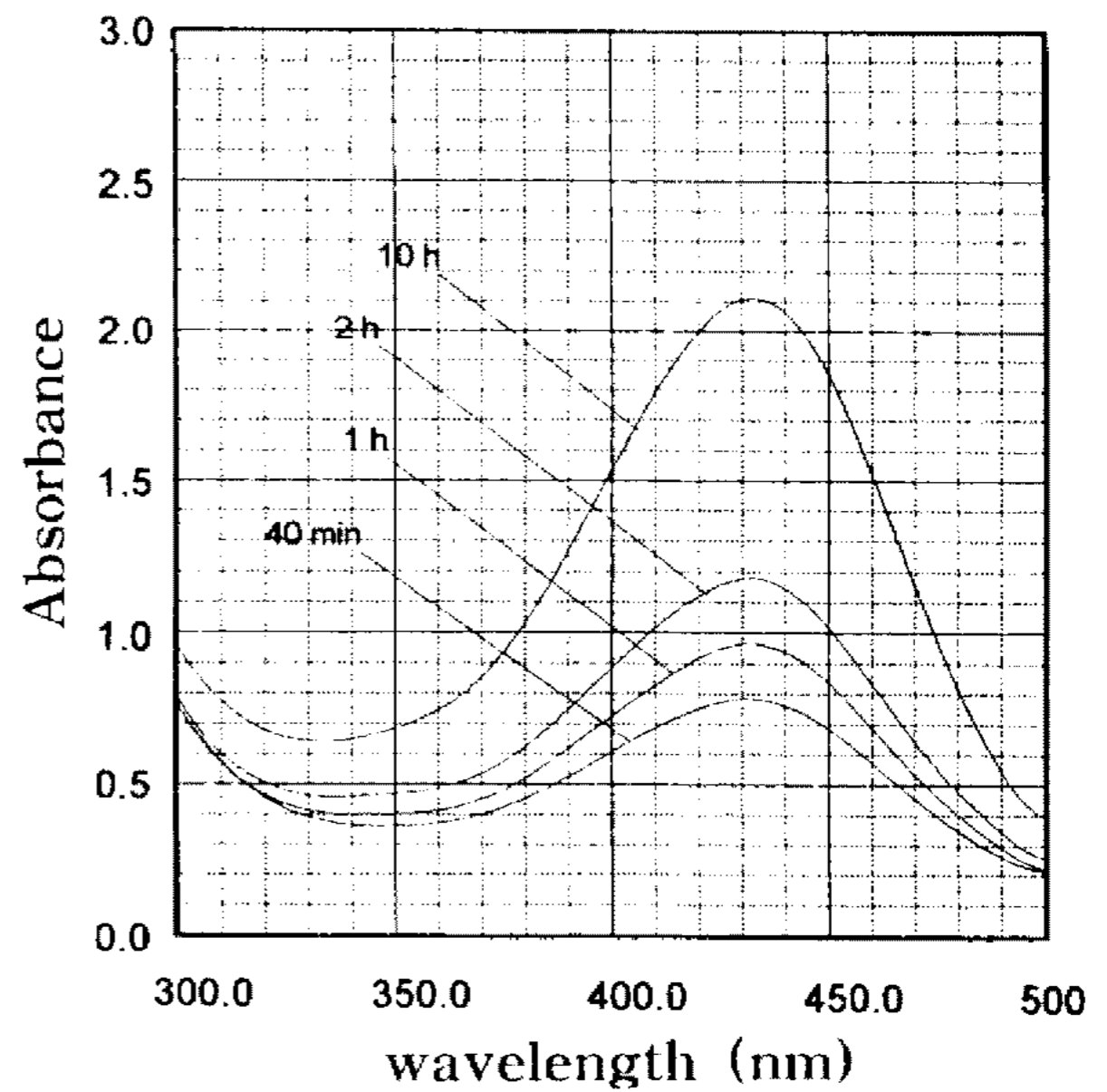


Fig. 7. Production of HOPDA from 2,3-DHBP with the crude enzyme from *E. coli* KK1. The reaction was performed in 10 mM potassium phosphate buffer containing 250 µM 2,3-DHBP at 25°C.

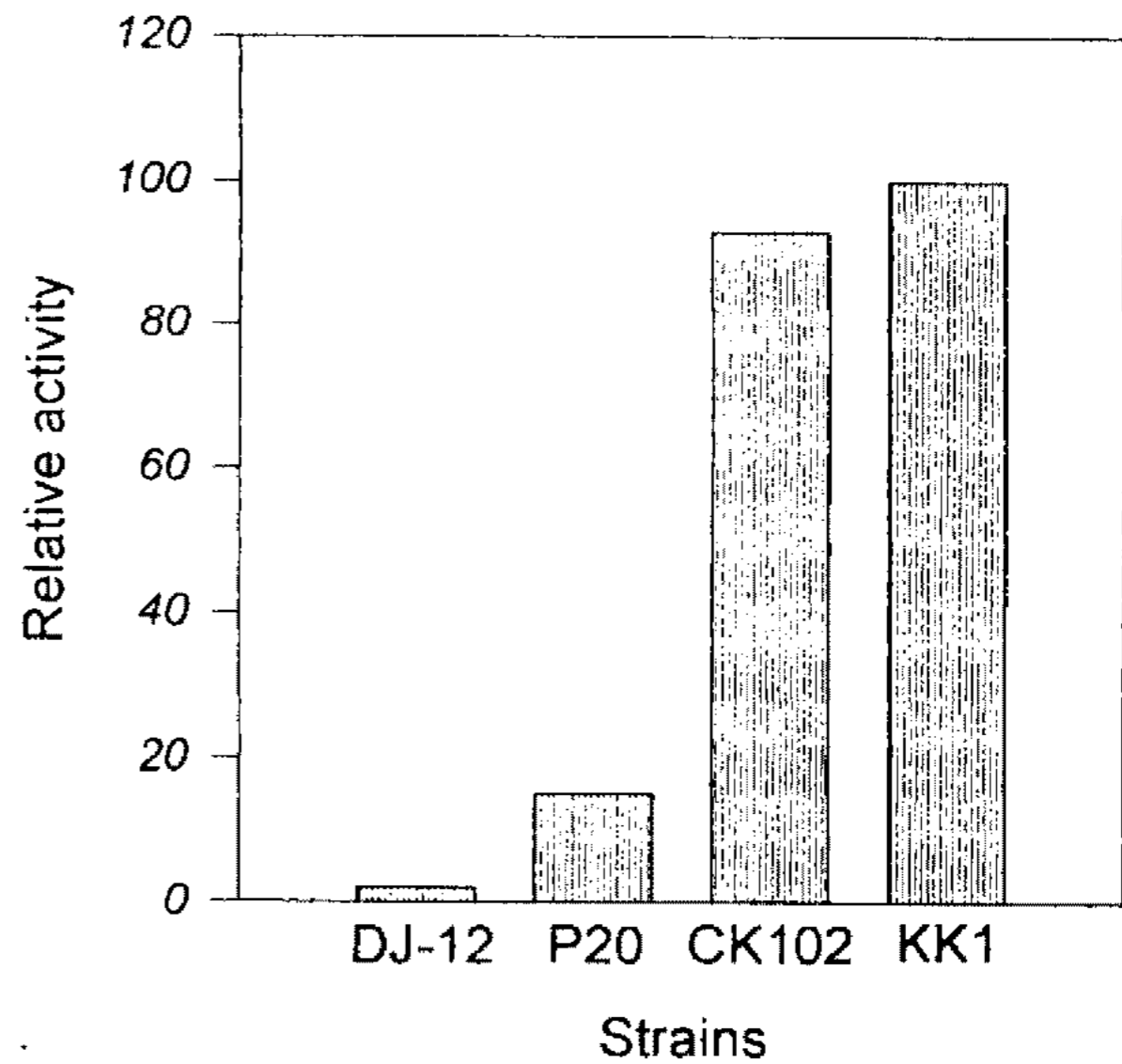


Fig. 8. 2,3-DHBP dioxygenase activities of *E. coli* KK1 and the natural isolates.

발현되었다. 그러나 pKS13의 *bphCD*를 pUC18을 이용하여 클로닝하였을 때에는 *E. coli*에서도 2,3-DHBD가 발현되었다. 이런 결과는 *E. coli*에서는 pUC18의 *lacZ* promoter를 이용하여 2,3-DHBD 유전자가 발현되는 반면 *Pseudomonas putida*에서는 2,3-DHBD 유전자가 자신의 promoter를 이용하여 발현되고 있음을 의미한다. 또, broad-host-range vector인 RSF1010 벡터를 이용하여 *Pseudomonas putida* SU83의 2,3-DHBD 유전자를 *E. coli*, *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 형질전환시킨 결과, *E. coli*에 비해 *Pseudomonas putida*와 *Pseudomonas aeruginosa*에서 높은 효

소 활성을 나타내었다(25). 그러므로 *pcbABCD* 유전자를 다양한 broad-host-range 벡터에 클로닝하여 PCBs를 분해하는 자연계 분리균주로 형질전환시킴으로서 분해능이 높으며 생태환경에 보다 적합한 균주를 개발할 수 있을 것이다.

## 요 약

Biphenyl과 4-chlorobiphenyl을 분해하는 자연계 분리 균주인 *Pseudomonas* sp. P20의 chromosomal DNA로부터 pBluescript SK(+)를 이용하여 *pcbABCD* 유전자를 클로닝하여 재조합플라스미드 pCK1을 제조하였고, 또 *pcbCD* 유전자를 포함하는 pCK102을 제조하였다. 방향족 탄화수소 화합물의 생분해는 벤젠고리의 개환 과정이 중요하기 때문에, 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP)의 벤젠고리의 개환에 관여하는 2,3-DHBP dioxygenase(2,3-DHBD) 유전자를 pKT230 벡터를 이용하여 pCK102로부터 클로닝하였다. *EcoRI*으로 절단한 pCK102와 pKT230 벡터를 ligation시켜 13.8 kb의 hybrid plasmid pKK1을 제조하였다. 2,3-DHBD 유전자를 포함하는 pKK1을 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 *E. coli* KK1 재조합 균주를 얻은 후, 2,3-DHBD의 활성을 측정하였다. *E. coli* KK1의 2,3-DHBD의 효소활성은 pBluescript SK(+)를 이용하여 제조한 재조합 균주인 *E. coli* CK102의 효소활성과 유사하였으나, *Pseudomonas* sp. DJ-12와 *Pseudomonas* sp. P20와 같은 자연계 분리균주보다 훨씬 높았다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비 그리고 연구의 일부는 교육부의 기초과학연구비(BSRI-95-4432)의 지원으로 수행되었음.

## 참고문헌

1. Asturias, J.A. 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.
2. Masai, E., A. Yamada, J.M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda and K. Yano. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079-2085.
3. 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.
4. Kikuchi, Y., Y. Yasukochi, Y. Nagata, M. Fukuda, and M. Takagi. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the *meta*-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* **176**: 4269-4276.
5. Youn, D.J., J.J. Han, C.K. Kim and Y. Kim. 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4-chlorobiphenyl catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 53-59.
6. Yadav, J.S., J.F. Quensen III, J.M. Tiedje and C.A. Reddy. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2560-2565.
7. Furukawa, K. and T. Miyazaki. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398.
8. 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.
9. Khan, A.A. and S.K. Walia. 1991. Expression, localization, and functional analysis of polychlorinated biphenyl degradation genes *cbpABCD* of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1325-1332.
10. Mondello, F.J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* **171**: 1725-1732.
11. Dowling, D.N., R. Pipke and D.F. Dwyer. 1993. A DNA module encoding *bph* genes for the degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *FEMS Microbiol. Lett.* **113**: 149-154.
12. Seeger, M., K.N. Timmis and B. Hofer. 1995. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2654-2658.
13. 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.
14. Hofer, B., L.D. Eltis, D.N. Dowling and K.N. Timmis. 1993. Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene* **130**: 47-55.
15. Kim, E., Y. Kim and C.K. Kim. 1996. Genetic structure of the genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid hydrolase from biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-degrading *Pseudomonas* sp. strain DJ-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 262-267.
16. Pélouquin, L. and C.W. Greer. 1993. Cloning and expression of the polychlorinated biphenyl-degradation gene cluster from *Arthrobacter* M5 and comparison to analogous ge-

- nes from gram-negative bacteria. *Gene* **125**: 35-40.
17. Haddock, J.D., L.M. Nadim and D.T. Gibson. 1993. Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. LB400. *J. Bacteriol.* **175**: 395-400.
  18. Hirose, J., N. Kimura, A. Suyama, A. Kobayashi, S. Hayashida and K. Furukawa. 1994. Functional and structural relationship of various extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas* origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 273-278.
  19. Furukawa, K., N. Tomizuka and A. Kamibayashi. 1979. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 301-310.
  20. Kim, E. and G.J. Zylstra. 1995. Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J. Bacteriol.* **177**: 3095-3103.
  21. Furukawa, K. and N. Arimura. 1987. Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene. *J. Bacteriol.* **169**: 924-927.
  22. Maeda, M., S. Chung, E. Song and T. Kudo. 1995. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 549-555.
  23. Nam, J.H., H.M. Oh and C.K. Kim. 1995. Cloning and expression of *pcbC* and *pcbD* genes responsible for 2,3-dihydroxybiphenyl degradation from *Pseudomonas* sp. P 20. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 68-73.
  24. Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi, and K. Yano. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* **171**: 2740-2747.
  25. Andreyeva, A.L., A.V. 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.
  26. Nagahari, K. and K. Sakaguchi. 1978. RSF1010 plasmid as potentially useful vector in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **133**: 1527-1529.
  27. Bagdasarian, M., R. Lurz, B.R. Eckert, F.C.H. Franklin, M.M. Bagdasarian, J. Frey and K.N. Timmis. 1981. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
  28. Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacterial degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 454-457.
  29. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  30. Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. Protein methods. Wiley-Liss Press, New York.
  31. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrought, N.E. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

(Received 14 August 1996)