

## *Pseudomonas* sp. S-47로부터 5-Chloro-2-Hydroxymuconic Semialdehyde Dehydrogenase를 암호화하는 *xylG* 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

박송이 · 이동훈 · 김영수<sup>1</sup> · 이 경<sup>2</sup> · 김치경\*

충북대학교 미생물학과 및 유전공학연구소, <sup>1</sup>충북대학교 약학과, <sup>2</sup>창원대학교 미생물학과

**Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *xylG* Gene Encoding 5C-2HMS Dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. S-47.** Park, Song-I, Dong-Hun Lee, Youngsoo Kim<sup>1</sup>, Kyoung Lee<sup>2</sup>, and Chi-Kyung Kim\*. Department of Microbiology, and <sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763 and <sup>2</sup>Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea – *Pseudomonas* sp. S-47 is capable of degrading 4-chlorobenzoate to produce 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (5C-2HMS) by the enzymes encoding by *xylXYZLTE* cluster. In this study, the resulting 5C-2HMS was confirmed to be transformed to 5-chloro-2-hydroxymuconic acid (5C-2HMA) by 5C-2HMS dehydrogenase. The *xylG* gene encoding 5C-2HMS dehydrogenase was cloned from the chromosomal DNA of strain S-47. The nucleotide sequence of *xylG* showed to be composed of 1,600 base pairs with ATG initiation and TGA termination codons. A deduced amino acid sequence of the 5C-2HMS dehydrogenase (XylG) exhibited 98%, 93%, and 89% identity with those of the dehydrogenases from *P. putida* mt-2, *P. putida* G7, and *Pseudomonas* sp. CF600, respectively.

**Key words:** *xylG*, Cloning and sequencing, 5C-2HMS, *Pseudomonas* sp. S-47

현대 사회의 급속한 발달로 수질 및 토양의 환경문제가 심각한 수준에 이르고 있다. 환경오염을 유발하는 방향족 탄화수소에는 naphthalene, toluene, benzene, benzoate, tryptophan 등이 있으며 이들은 치환되어 있는 염소의 수나 위치에 따라 다양한 분해특성을 나타낸다[2].

미생물에 의한 난분해성 오염물질의 연구는 4-chlorobiphenyl(4CB), biphenyl(BP), phenol, toluene, cresol과 같은 간단한 형태인 탄화수소들을 기질로 이용하여 연구되고 있다. 특히 다양한 종의 *Pseudomonas*에 의한 분해는 benzene이나 phenol을 catechol로 분해하거나 toluene 또는 cresol로부터 4-methylcatechol로 분해하는 과정이 보고되어 있다[9].

이러한 방향족 탄화수소의 생분해를 연구하기 위해 가장 많이 연구되고 있는 물질 중에 하나가 4-chlorobenzoic acid (4CBA)이다. 4CBA는 벤젠고리의 *para*-위치에 염소가 하나 치환된 구조로 물리·화학적으로 안정한 구조이며 물에 대한 용해도가 높고, 비교적 약한 독성으로 인하여 halogenated aromatic compounds 분해 과정을 연구하는데 좋은 특성을 지닌다. 또한 aromatic-ring cleavage에 의한 분해 과정이 보고되었다[1].

4CBA의 분해과정 중에 생성되는 Chlorocatechol은 *ortho*-ring cleavage와 *meta*-ring cleavage에 의해 분해되는 과

정이 보고되었다[4]. 4-chlorocatechol(4CC)은 extradiol dioxygenase에 의해 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (5C-2HMS)로 분해되고, 5C-2HMS는 2-hydroxypent-2,4-dienoate와 4-hydroxy-2-oxohexanoate를 거쳐 acetyl-CoA로 대사된 후 TCA cycle로 진행된다[3,5,6,8,13]. 이와 같은 분해과정 중에 나타나는 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (5C-2HMSD)를 암호화하는 *xylG*의 기능은 *P. putida* CF600, *P. putida* G7, *P. putida* mt-2 등의 유사한 기능을 갖는 유전자인 *bphG*, *dmpC*, *nahl* 등에서 각각 보고된 바 있다[1,5,7].

본 실험에서 사용된 *Pseudomonas* sp. S-47은 울산 석유화학공장에서 Seo 등 [18]에 의해서 분리된 4CBA 분해 균주로서, 본 연구실에서 이미 보고된 바와 같이 4CBA를 거쳐 4CC로 분해된 후 4-chlorocatechol-2,3-dioxygenase에 의해 5-Chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde로 진행된다[11,12,13,15].

본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. S-47이 5C-2HMS를 어떠한 경로로 분해하는지 연구하였고, 5C-2HMS를 분해하는 dehydrogenase를 암호화하는 유전자인 *xylG*를 클로닝하여 염기서열의 분석과 분해능을 측정하여 지금까지 밝혀진 여러 dehydrogenase과의 진화적 유연 관계를 밝혔다.

### 재료 및 방법

#### 실험균주 및 플라스미드와 배양

\*Corresponding author

Tel. 82-43-261-2300, Fax. 82-43-264-9600

E-mail: environ@trut.chungbuk.ac.kr

본 실험에서는 4CBA를 분해할 수 있는 균주인 *Pseudomonas* sp. S-47을 사용하였고, 형질 전환을 위한 숙주균과 벡터로 *E. coli* XL1-Blue와 pBluescriptII SK(+) phagemid(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하였다. 형질 전환을 위하여 *Pseudomonas* sp. S-47의 chromosomal DNA로부터 4CBA를 분해하는 유전자를 포함하는 재조합 균주인 pCS1과 *xyIG* 유전자를 포함하고 있는 pCS202를 사용하였다. *Pseudomonas* sp. S-47과 형질전환에 사용한 숙주 세포 그리고 플라스미드의 특성은 Table 1에 나타내었다.

4CBA 분해균인 *Pseudomonas* sp. S-47를 배양하기 위해서 MM2 고체 최소배지를 사용하였다. MM2 고체 최소배지의 조성은 1  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 8.5mM NaCl, 18mM(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>를 함유한 10mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 단일 탄소원으로 4CBA와 agar 1.5%를 첨가하였다.

완전배지로는 LB(Luria-Bertani) 배지로 증류수 1L에 Bacto trypton 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g되게 첨가하여 사용하였고, 고체배지의 경우 agar powder를 1.5%첨가하여 사용하였다. 재조합 균주의 선택 배지에는 ampicillin을 50 $\mu$ g/ml되게 첨가하여 사용하였고 액체배지는 37°C에서 진탕 배양하였다.

#### DNA 조작 및 전기영동

재조합 플라스미드의 분리는 alkaline lysis 방법을 이용하였고, DNA subcloning, 제한효소처리, gel 전기영동 및 형질전환 등은 일반적으로 알려진 방법을 사용하였다[16]. 선별배지로는 ampicillin이 50 $\mu$ g/ml 첨가된 LB배지를 이용하였다. Sequencing을 위한 재조합 플라스미드는 Wizard Plus Minipreps(Promega Inc., Madison, WI, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출된 재조합 플라스미드의 염기서열은 Imager IITM system(Bioneer co., Chungbuk, Korea)을 이용하여 확인하였다.

#### 5C-2HMS의 분해

기질을 제조하기 위해 Catechol 2,3-dioxygenase 유전자를 갖고있는 *E. coli* CSS202를 선별배지로 선별하여 배양한 후 1mM catechol을 첨가한 다음 1시간 동안 상온에서 방치하였다. Catechol이 기질로 사용하고자 하는 5C-2HMS로 완전히 전환될 때를 알아보기 위해 10분 간격으로 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 catechol의 분해를 측정하고, 완전하게 5C-2HMS로 전환되었을 때 원심분리(6,000 × g, 4°C, 10분)한 후, 상층액을 분리하여 UV-VIS spectrophotometer로 측정하였다. 이와 같은 방법으로 380 nm에서 5C-2HMS를 확인한 후 이것을 기질로 사용하였다.

5C-2HMSD의 분해능 측정은 resting cell assay를 이용하였다. Resting cell assay에 필요한 세균추출액을 준비하기 위해 *xyIG*를 갖고있는 *Pseudomonas* sp. S-47과 *E. coli* CSS202, *E. coli* ENV5를 각각 선별배지에서 배양한 후 기질인 5C-2HMS가 함유된 50mM sodium potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 균체를 첨가하여 배양했다. 또한 대조군으로는 기질인 5C-2HMS만 첨가되어 있는 50 mM sodium potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 사용하였다. 각 균주가 갖고있는 dehydrogenase의 분해능은 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 균체와 기질간의 분해되는 정도를 측정하였다.

#### *xyIG*의 클로닝 및 염기서열 분석

*xyIG*의 subcloning은 *Pseudomonas* sp. S-47로부터 cloning한 재조합 플라스미드인 pCSS202에서부터 subcloning을 하였다. *xyIG*를 subcloning 하기 위하여 재조합 플라스미드인 pCSS202로부터 pCSS202와 SK(+)II를 PstI과 ClaI으로 절단하여 각각 잘린 절편을 동량으로 섞은 다음, T4 DNA ligase를 이용하여 ligation을 하여 숙주세포인 *E. coli* XL1-Blue에 Sambrook 등[16]의 방법에 따라 형질 전환하였다. 형질 전환 후 선별배지를 이용하여 LB고체배지에 X-

**Table 1. Bacterial strains and plasmids used and prepared in this work**

Strain or plasmid	Relevant marker	Source and Reference
<b>Strain</b>		
<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	4CBA <sup>+</sup> , 4CC <sup>+</sup> , 4MC <sup>+</sup> , CT <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup>	Seo <i>et al.</i> , 1998
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supEA4 hsdR17 recA1 end1 gyrA46 thi F'</i> [ <i>proAB</i> + <i>lacZ</i> ΔM15Tn10( <i>tetr</i> ) <i>relA1</i> Δ( <i>lac-proAB</i> )	Stratagene Ltd.
<b>Plasmid</b>		
pBluescript SK(+) <sup>II</sup>	Ap <sup>r</sup> cloning and sequencing vector	Stratagene Ltd.
pCSS202	Ap <sup>r</sup> 4.3kb <i>XhoI</i> - <i>PstI</i> insert encoding 4CBA degrading genes from pCS201 by using pBluescript SK(+) <sup>II</sup>	Kim <i>et al.</i> , 1998
pENV5	Ap <sup>r</sup> 2.6kb <i>PstI</i> - <i>ClaI</i> fragment derived from pCSS202	This work
pENV6	Ap <sup>r</sup> 2.0kb <i>PstI</i> - <i>XhoI</i> fragment derived from pENV5	This work
pENV7	Ap <sup>r</sup> 0.8kb <i>XhoI</i> - <i>ClaI</i> fragment derived from pENV5	This work
pENV8	Ap <sup>r</sup> 1.4kb <i>PstI</i> - <i>SacII</i> fragment derived from pENV5	This work

Abbreviation: 4CBA, 4-chlorobenzoate; 4CC, 4-chlorocatechol; 4MC, 4-methylcatechol; CT, catechol; AP, ampicillin (50  $\mu$ g/ml)

gal(20 µg/ml in dimethylformamide)과 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG, 200 µg/ml)를 도말하고, 이 배지에 bacterial solution을 도말하여 *xyIG*를 갖는 집락을 1차 선 발하였다.

염기서열 결정을 위해 Sambrook 등[16]에 의한 방법을 이용하여 염기서열 결정을 위한 클론들을 준비하였다. 염기서열 결정을 위한 클론들의 제조는 재조합 플라스미드인 pENV5로부터 각각 *PstI*와 *XhoI*, *XhoI*와 *ClaI*으로 절단 후 전기영동을 통해 2.0kb와 0.8kb 절편을 선택하였다. 선택된 각 절편을 동일한 제한효소로 처리한 플라스미드 벡터인 SK에 T<sub>4</sub> DNA ligase를 사용하여 ligation하였고 이렇게 하여 얻어진 클론은 각각 pENV6와 pENV7으로 명명하였다. 그리고, 재조합 플라스미드인 pENV5를 *PstI*과 *SacII*로 절단하여 전기영동을 통해 선택된 1.4kb 절편을 상기와 동일한 방법으로 pENV8를 제조하였다. 이들은 염기 분석을 위해 만든 재조합 균주로서 *xyIG*를 포함하는 pENV5보다 작은 크기로 제작하였고 각각의 분해능을 resting cell assay로 확인하였다.

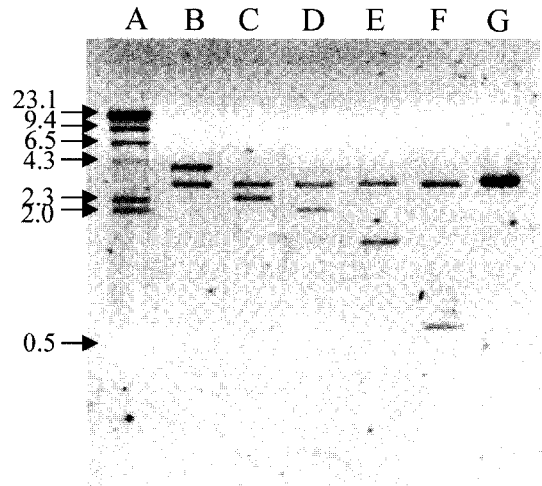
Wizard Plus Minipreps을 이용해 준비된 double strand DNA에 2N NaOH, 3M sodium acetate(pH 4.8), 100% ethyl alcohol, 그리고 70% ethyl alcohol을 사용하여 주형으로 사용하였다. 이렇게 제조된 주형 DNA는 Bionex, Inc.(Seoul)에 의뢰하여 분석하였고, 염기서열과 아미노산 서열은 DNASIS/PROSIS(Hitachi V. 7.06) program을 사용하여 분석하였다. GenBank database에서의 염기서열과 아미노산 서열의 검색은 National Center for Biotechnology Information Server를 통해 BLAST program으로 수행하였다. Multiple sequence alignment는 CLUSTAL X program을 사용하였고 이를 바탕으로 N-J method로 tree를 그렸으며 TreeView로 dendrogram을 그려 분석하였다.

**결과 및 고찰**

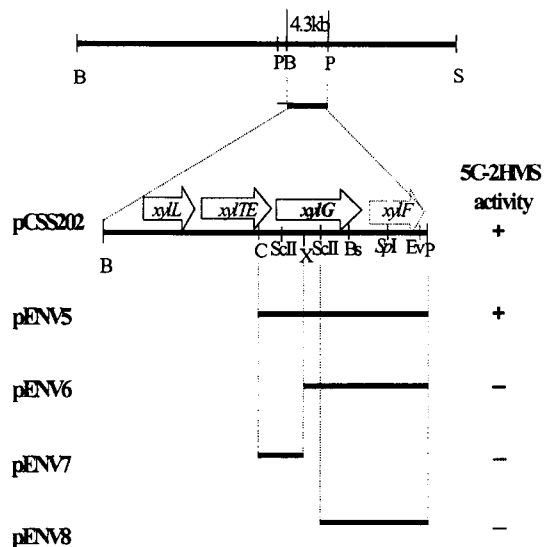
***xyIG*의 클로닝**

*xyIG*를 subcloning하기 위해 *Pseudomonas* sp. S-47의 5C-2HMS 분해 유전자가 들어있는 재조합 플라스미드인 pCSS202로부터 *ClaI*과 *PstI* 절편을 SK 벡터에 ligation하여 얻은 재조합 플라스미드를 pENV5라 명명하였다. 재조합된 pENV5의 확인은 전기영동을 통하여 Fig. 1의 lane C에서 확인하였다.

5C-2HMS 분해 유전자가 들어있는 pENV5로부터 삽입단편의 크기를 줄이기 위하여 pENV5에서 2.0kb 크기로 절단되도록 *PstI*와 *XhoI*으로 처리하고 같은 방법으로 0.8kb 크기의 *XhoI*와 *ClaI*을 처리하여 절단한 후 형질전환 시켰다. 이렇게 형질전환 시킨 후 고체배지에서 흰색을 나타내는 집락을 선별하여 Fig. 2에서와 같이 pENV6와 pENV7이라 명명하였다. 또한 pENV5를 *PstI*과 *SacII*로 절단하여



**Fig. 1. Electrophoretic patterns of subclones digested with several restriction enzymes.**  
Lane: A, Size marker (*λ*HindIII); B, pCSS202 (*Bam*HI-*Pst*I); C, pENV5 (*Cla*I-*Pst*I); D, pENV6 (*Xho*I-*Pst*I); E, pENV8 (*Sac*II-*Pst*I); F, pENV7 (*Cla*I-*Xho*I); G, SK vector



**Fig. 2. Physical map of recombinant plasmid pCSS202 and its subclones.**  
B, *Bam*HI; P, *Pst*I; Ev, *Eco*RV; ScII, *Sac*II; Bs, *Bst*XI; C, *Cla*I; X, *Xho*I. : (+) activity or (-) no activity.

상기와 동일한 방법으로 1.4kb의 절편을 제조하여 pENV8이라 명명하고 이들은 Fig. 1에서와 같이 전기영동을 통해 각각 lane D, lane E, lane F에서 삽입된 것을 확인하였다.

이와 같은 클로닝 과정을 통하여 4CC를 분해할 수 있는 pCSS202으로부터 5C-2HMS를 분해하는 pENV5와 염기서열 분석을 위한 작은 크기의 재조합 플라스미드를 얻었고, 5C-2HMSD의 activity 결과로 *xyIG*는 2.5kb인 *ClaI*과 *PstI* site에 위치하고 있음을 알 수 있었다.

5C-2HMS의 분해과정

5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase의 분해능을 측정하기 위한 기질로는 pCSS202에 의해 4CC가 분해되어 생성되는 5C-2HMS를 사용하였다. 클로닝한 pENV5의 분해능을 알아보기 위하여 4CBA와 4CC 분해 유전자를 모두 갖고있는 모균주인 *Pseudomonas* sp. S-47과 4CC 분해 유전자를 갖고있는 것으로 보고된 pCSS202로부터 5C-2HMSD의 활성을 측정하였다(Fig. 3). 또한 대조군으로는 동일한 조건에 분해균주인 *Pseudomonas* sp. S-47과 pCSS202, pENV5를 넣지 않은 조건으로 하여 기질이 균주의 영향없이 분해되는지의 여부를 확인하였다. 그 결과 대조군에서는 시간이 경과함에도 기질이 분해되어 감소되지 않는다는 것을 알 수 있었고, 이것으로 기질은 분해균주에 의해서만 분해된다는 것을 확인하였다. *Pseudomonas* sp. S-47과 pCSS202, pENV5는 기질로 사용한 5C-2HMS를 24시간 내에 분해되는 높은 활성을 나타냈다. 5C-2HMS dehydrogenase에 NAD<sup>+</sup>를 첨가하였을 경우, NAD를 첨가하지 않은 것에 비해 기질인 5C-2HMS를 빠르게 분해되는 결과를 얻었고 이를 근거로 5C-2HMS dehydrogenase는 NAD<sup>+</sup>를 환원함과 동시에 5C-2HMS가 분해되는 것을 5C-2HMS의 흡수파장인 380nm에서 확인하였다. 이 결과로 pENV5에는 5C-2HMS를 분해할 수 있는 유전자인 *xyiG*가 정상적으로 형질 전환되었다는 것을 알 수 있었다. 또한 *xyiG* 유전자의 일부를 포함하고 있는 재조합 플라스미드인 pENV8의 염기서열 분석 결과, *xyiG*가 끝나는 정지 코돈 이후에 *xyiF*의 개시코돈이 시작되는 것을 확인하였다. 그러므로 *Pseudomonas* sp. S-47은 5C-2HMS를 *xyiG*에 의하여 암호화되는 5C-2HMS dehydrogenase에 의하여 Fig. 4에서 보는 바와 같이 분해하였다. 이는 그 결과 산물

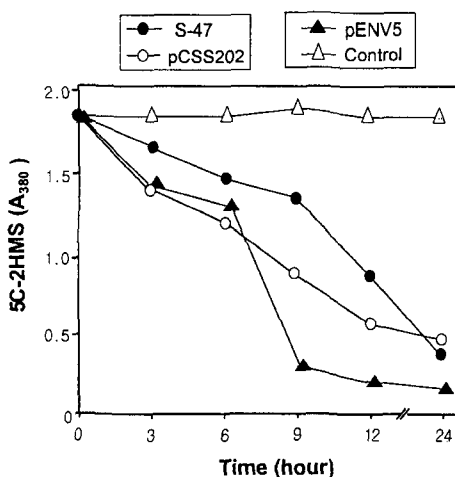


Fig. 3. Degradation of 5C-2HMS by *Pseudomonas* sp. S-47 and its clones. Control was the buffer containing 5C-2HMS without bacterial inoculum.

이 5-chloro-2-hydroxymuconic aldehyde (5C-2HMA)이라는 것을 Inoue등(1995)와 Hughes 등(1984)의 논문에 비추어 확인할 수 있었다.

본 연구에서 확인된 5C-2HMS dehydrogenase는 NAD 환원에 의해 enol form으로 변화되는 ring 구조의 변환을 가져온다. 이것은 계속 진행되는 과정에 이용되는 isomerase와 decarboxylase를 유도할 수 있음이 알려졌다[8]. 따라서 hydrolase에 의한 경로에서는 keto form으로 변환되는 결과가 나타나며 이것을 종합해 볼 때 substrate따라 유도되는 enzyme이 다르며 그 결과 분해되어 진행되는 경로가 달라진다는 것을 알 수 있다. 또한 dehydrogenase의 분해 경로에 대하여 이미 연구 보고되어진 결과와 비교한 결과, *Pseudomonas* sp. S-47은 5C-2HMS dehydrogenase를 암호화하는 *xyiG* 유전자에 의해 5C-2HMS에서 5-chloro-2-hydroxymuconic aldehyde (5C-2HMA)로 분해되는 meta-cleavage 경로로 진행된다는 것을 알 수 있었다[9,10,11].

*xyiG*의 염기서열 및 5C-2HMS dehydrogenase의 상동성 분석

5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (5C-2HMS)를 암호화하는 *xyiG*의 염기서열을 분석하기 위하여 재조합 플라스미드인 pENV5로부터 여러 가지 클론들

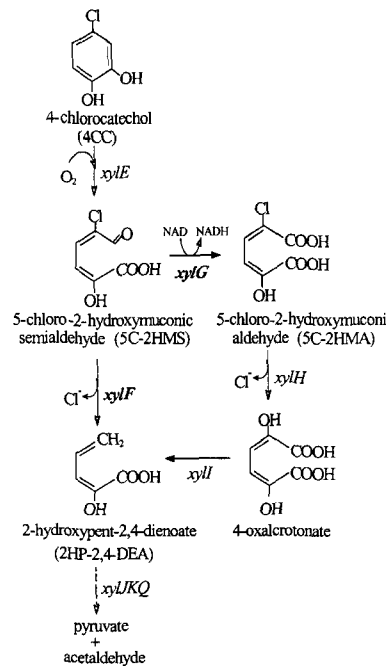


Fig. 4. Degradative pathway of 4-chlorocatechol by *Pseudomonas* sp. S-47 via 5C-2HMS. *xyiE*, 4CC 2,3-dioxygenase; *xyiG*, 5C-2HMS dehydrogenase; *xyiF*, 5C-2HMS dehydratase; *xyiH*, 4-oxalocrotonate isomerase; *xyiI*, 4-oxalocrotonate decarboxylase; *xyiJ*, 2-oxopent-4-enoate hydratase; *xyiK*, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase; *xyiQ*, acetaldehyde dehydrogenase.

을 얻어 유전자의 위치와 염기서열을 결정하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 5C-2HMSD 유전자는 catechol 2,3-dioxygenase 유전자로부터 33개 intergenic sequence의 downstream에 위치하고 있다. 재조합 플라스미드 pCSS202에는 catechol 2,3-dioxygenase (C23O)가 클로닝되어[14] 염기서열이 보고된 바 있다. 이것에 따르면 C23O 유전자를 이용하여 염기서열을 분석한 결과 C23O 유전자의 downstream에 5C-2HMS dehydrogenase를 암호화하는 유전자 순으로 인접하고 있는 *meta*- operon이 있음을 알 수 있다.

*Pseudomonas* sp. S-47의 dehydrogenase 유전자는 1,600개의 염기쌍으로 구성된 1개의 open reading frame (ORF)으로 구성되어 있으며, ATG 개시코돈과 TGA 정지코돈을 가지고 있다. ATG 개시코돈으로부터 위쪽으로는 라이보솜 결합 염기서열로 추정되는 결합부위 (5'-AGAG-3')이 존재하며 이 ORF는 ATG와 TGA를 갖으며 정지코돈 (TGA)에

서 9개의 염기쌍 아래쪽에 5-chloro-2-hydroxymuconic acid dehydrilase 유전자의 개시코돈인 ATG가 위치하고 있다. 또한 *xyIG*는 487개의 아미노산으로 구성된 polypeptide를 암호화 할 수 있으며 유전자의 발현에 필요한 라이보솜 결합 부위인 ribosomal binding site(RBS)는 *xyIG*의 위쪽에 나타났다. 이러한 염기서열 분석으로 5C-2HMS dehydrogenase는 NAD<sup>+</sup>의 환원과 함께 기질인 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde(5C-2HMS)를 5-chloro-2-hydroxymuconic acid(5C-2HMA)로 전환시키며 4-chlorobenzoate (4CBA)과 5C-2HMS에 대한 본 연구실에서 연구 보고된 결과를 바탕으로 분석한 결과, 4CBA의 분해산물인 catechol과 5C-2HMS를 분해할 수 있는 재조합 플라스미드 pCSS202에는 *xyLL*, *xyIT*, *xyIE*, *xyIG*, *xyIF*의 순서로 되어 있고, pENV5는 *xyIG*와 *xyIF*의 일부를 포함하고 있다는 것을 확인하였다. 또한 5C-2HMS는 *xyIF*에 의해 암호화되

```

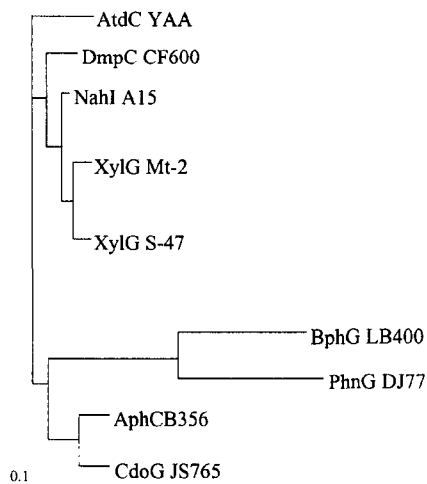
5' TTCATGACCGTGTGCTGACCTGATGGTCGGTACGACTTATTGCAGAGATTGCGCAGATGAA 60
      xyIE ←
GAAATCAAGCATTTCATTAGCGGTGCCTTCGTCGGTTCGGCCAGCGGCAAGCTGTTTCGAC 120
AATGTTCAGCCCGGCCAACGGCCAGGTGATCGGCCGCGTCCACGAGGCCGGCCGCGCCGAG 180
      SacII
GTCGACGCGCGGTTCAGGGCGGCACGCGCTGCGCTGAAGGGACCCTGGGGGAAGATGACG 240
GTGGCCGAGCGCGCTGAGATTCTGCATCGCGTGGCCGATGGCATCACGGCCGCGCTTCGGC 300
ACCCTGACCCGCGACCTTGAGCAGTTTCGCCGAGTGCCAACGGGTGATGGCGCGCGCGCTC 360
      XhoI
GAGTTTCTCGAGGCCCAATGCCTGGACACCGGCAAGCCGAAGTCGCTGGCCAGCCACA 420
TCGACATTCCGCGCGGCGCCAATTTCAAGGTGTTCCGCCGACCTGCTCAAGAATGTTGC 480
CAATGAAGCCTTCGAGATGGCCACCCCGACGGCGCCGGTGCCTCAACTACGGCGTGC 540
CCGGCCCAAGGGGGTGATCGGGGTGATCAGCCCTGGAACCTGCGCTGCTGCTCATGAC 600
CTGGAAGATCGGCCCCGCCCTGGCCTGCGGCAACTGCGTGGTGGTCAAACCATCCGAGGA 660
AACCCCGTGACCGCCACCCTGCTCGGCGAGGTGATGCAGGCCCGCGGTGTGCCGGCCGG 720
TGTGCCGGCCGGCGTGTACAACGTGGTGCACGGTTTCGGCGCGGATTCGGCCGGGGCCTT 780
CCTCACCGAGCACCCGGACGTCGACGCTACACCTTACC GGCGAGACCGGCACCGGCGA 840
      SacII
AACCATCATGCGCGCGCGGCCAAGGGCGTGCGCCAGGTGTCGCTGGAGCTGGGCGGCAA 900
GAACGCCGCATCGTCTTCGCCGACTGCGATATGGACAAGGCCATCGAGGGCACCCCTGCG 960
CTCGGCTTCGCCAACTGCGGCCAGGTGCTGCCTGGGCACCGAGCGGGTGTATCTCGAGCG 1020
GCCGATCTTCGACGCGTTCGTCGCCCGCCTGAAGGCCGGCGCGGAAGCGTTGAAGATCGG 1080
CGAACCGAACGATCCAGAGGCCAATTTCCGCCCGCTGATCAGCCATAAGCCCCGTGAAAA 1140
AGTCCCCAGTTACTACCAGCAGGCAGTCGACGACGGCGCCACCGTTGTCACCGGCGGCGG 1200
CGTGCCGGAGATCGCGCGCACCTGGCCGGCGGCGCCTGGGTGCAGCCGACTATCTGGAC 1260
CGGCTGGCCGACGATTCGGCGGTGGTCACCGAGGAAATCTTCGGCCCTGCTGCCATAT 1320
CCGCCGTTTCGACAGCGAGGAGGAAGCCATTGAACTGGCCAAACAGCCTGCCTTACGGCCT 1380
      BstXI
GGCCTCGGCGATCTGGACCGAGAACGCTTCGCGCGCCACC CGCTGCGCGGCGAGATTGA 1440
GGCCGGCATCGTCTGGGTCAACAGCTGGTTCTGCGCGACCTGCGCACCGCCTTCGGCGG 1500
CAGCAAGCAGTCGGGCATCGGGCGGAAGGGGGTGTGCACTCGCTGGAGTTCTACACCGA 1560
GCTGAAAAACATCTGTGTGAAACTTTGAGGACCTGGTATGCACGCACCGCAGCAAAGCCC 1620
      xyIG ←
TGAAATCGGTTCGCGAAATCCTCGCGCC 3'

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of *xyIG* from *Pseudomonas* sp. S-47.

는 5C-2HMS hydrolase(HMSH)에 의해 직접 2-hydroxypent-2,4-dienoate(2HP-2,4-DEA)로 분해되는 경로가 보고되어 있다[10][11]. 이러한 유전자의 위치는 dehydrogenase나 hydrolase에 의해 분해되는 경로로써, 다음 생성물을 형성하는 결정적인 역할을 한다.

*Pseudomonas* sp. S-47의 5C-2HMS dehydrogenase는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 아미노산 염기서열과 유전자의 구조적 특징이 비슷한 균주 중 *P. putida* mt-2와는 98%의 상동성을 보였고 *P. stutzeri* A15와 *P. sp.* CF600의 5C-2HMSD와는 80%이상의 상동성을 보였다. 그러나 이에 비해 *Pseudomonas cepacia* LB400과 *Pseudomonas* sp. DJ77의 5C-2HMSD와는 45% 미만의 상동성을 보였다. 이런 상당한 homology는 이들 유전자가 공통된 구조적 특징을 나타낸다는 것을 보여준다. 이 dehydrogenase는 각 strain마다 명명되어 있는 것은 다르지만 대사에 관여하는 기능이 유사하고 *xyiL*, *xyiT*, *xyiE*, *xyiG* 등과 같이 유사한 operon의 유전자 순서와 같음으로써, 진화적으로 매우 유사함을 알 수 있다. 또한 GenBank database에서 유사한 기능의 유전자끼리의 염기서열과 아미노산 서열을 dendogram을 그려 분석해 본 결과, *xyiG*와 같은 기능을 하는 유전자는 HMS dehydrogenase pathway를 갖는 균주임을 추정할 수 있었다.



**Fig. 6. Phylogenetic relationship of the levels of homology among the amino acid sequences of different genes in dehydrogenase family.**

Vertical lines indicate divergence events. Lengths of horizontal lines represent relative times since divergence. The GenBank accession numbers of the genes are shown in parenthesis as follows: YAA, *Acinetobacter* sp. YAA (AB008831); CF600, *Pseudomonas putida* CF600 (P19059); A15, *Pseudomonas stutzeri* A15 (AF039534); Mt-2, *Pseudomonas putida* Mt-2 (V0116); S-47, *Pseudomonas* sp. S-47; LB400, *Pseudomonas* sp. LB400 (X76500); DJ77, *Pseudomonas* sp. DJ77 (AF023839); B356, *Comamonas testosteroni* (U47638); JS765, *Comamonas* sp. JS765 (AF190463).

이렇게 비교한 유전자들의 아미노산을 분석하면 이들 conserved amino acid 중에서 Gly-232-237 및 Gul-478로 알려진 것과 비교할 경우 *Pseudomonas* sp. S-47의 아미노산 서열에서 상동성을 보였다. 그 중에 Glu-254와 Cys-288이 sequences 상에서 동일하였다. Cys-288은 HMS dehydrogenase와 NAD<sup>+</sup>가 직접적으로 결합하는 잔기이고, Glu-254는 charge relay network이나 또는 catalytic nucleophile로 작용하는 것으로 보고되어 있다[10]. 그러나 *xyiG*에 대한 연구와 더불어 그 이외의 유전자들의 염기서열은 완전히 밝혀지지 않고 있어 이에 대한 연구가 계속 진행되어야 한다.

**요 약**

*Pseudomonas* sp. S-47은 *xyiXYZLTE* 유전자에 의하여 암호화되는 효소군에 의하여 4CBA를 분해하여 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde(5C-2HMS)를 생성하는데, 본 연구에서는 이 5C-2HMS의 다음 분해과정을 확인하였다. *xyiXYZLTE* 유전자와 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase(5C-2HMSD)를 암호화하고 *xyiG* 유전자를 포함하는 재조합 균주인 pCSS202로부터, *xyiG* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pENV5를 만들었다. 이 플라스미드는 2-hydroxymuconic semialdehyde, 3-chloromuconate, 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate, 2-hydroxy-5-methylmuconic semialdehyde와 같은 aromatic compound에서 분해능을 나타냈으며, 그 중 5C-2HMS에서 가장 높은 분해능을 나타내었다. 또한 5C-2HMSD를 암호화하는 유전자인 *xyiG*의 염기서열을 분석한 결과, 약 1,600 bp의 염기와 486개의 amino acid residue를 갖고있는 것을 확인하였다. *P. sp.* S-47의 *xyiG* 유전자를 비교 분석한 결과 *P. putida* CF600, *P. putida* G7과 *P. putida* mt-2 등의 5C-2HMS dehydrogenase와 85% 이상의 amino acid homology를 보여주었다.

**감사의 말**

본 연구는 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-2000-015-DP0338)의 지원으로 수행되었음

**REFERENCES**

1. Arendorf, J. J. and D. D. Focht. 1995. A meta-cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 443-447.
2. Brinkmann, U. and W. Reineke. 1992. Degradation of chlorotoluenes by in vivo constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of meta-path-

- way. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 81–88.
3. Cerdan, P., A. Wasserfallen, M. Rekik, K. N. Timmis, and S. Harayama. 1994. Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenases encoded by TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth. *J. Bacteriol.* **176**: 6074–6081.
  4. Harayama, S., M. Rekik, A. Wasserfallen, and A. Bairoch. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequence of catechol oxidation genes of pWWO and NAH7 plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 241–247.
  5. Harayama, S. and R. Monique. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* **264**: 15328–15333.
  6. Harayama, S. and M. Rekik. 1990. The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprises 13 genes. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 113–120.
  7. Harayama, S., M. Kok, and E. L. Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 565–601.
  8. Horn, J. M., S. Harayama, and K. N. Timmis. 1991. DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2459–2474.
  9. Hughes, E. L., R. C. Bayly, and R. A. Skurray, 1984. Evidence for isofunctional enzymes in the degradation of phenol, *m*- and *p*-toluate, and *p*-cresol via catechol *meta*-cleavage pathways in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **158**: 79–83.
  10. Inoue, J., J. P. Shaw, M. Rekik, and S. Harayama. 1995. Overlapping substrate specificities of benzaldehyde dehydrogenase (the *xylC* gene product) and 2-hydroxybutyrate dehydrogenase (the *xylG* gene product) encoded by TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **177**: 1196–1201.
  11. Keil, H., S. Keil, R. W. Pickup, and P. A. Willams. 1985. Evolutionary conservation of genes coding for *meta* pathway enzymes within TOL plasmids pWWO and pWW53. *J. Bacteriol.* **164**: 887–895.
  12. Kim, K. P., D. I. Seo, K. H. Min, J. O. Ka, Y. K. Park, and C. K. Kim. 1997. Characteristics of catechol 2,3-dioxygenase produced by 4-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas* sp S-47. *J. Microbiol.* **35**: 295–299.
  13. Kim, K. P., D. I. Seo, D. H. Lee, Y. Kim and C. K. Kim. 1998. Cloning and expression in *E. coli* of the genes responsible for degradation of 4-chlorobenzoate and 4-chlorocatechol from *Pseudomonas* sp. S-47. *J. Microbiol.* **36**: 99–105.
  14. Kim, Y., B. Choi, J. Lee, H. Chang, and K. R. Min. 1992. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **183**: 77–82.
  15. Noh, S. J., Y. Kim, K. H. Min, T. B. Karegoudar, and C. K. Kim. 2000. Cloning and nucleotide sequence analysis of *xylE* gene responsible for *meta*-Cleavage of 4-chlorocatechol from *Pseudomonas* sp. S-47. *Mol. Cells.* **10**: 475–479.
  16. Park, D. W., Y. Kim, S. M. Lee, J. O. Ka, and C. K. Kim. 2000. Cloning and nucleotide sequence analysis of *xylL* gene responsible for 4CBA-dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. S-47. *J. Microbiol.* **38**: 275–280.
  17. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbour, N.Y.
  18. Sentchilo, V. S., A. N. Perebituk, A. J. B. Zehnder, and J. Roelof van der Meer. 2000. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains Isolated from different contaminated sites in belarus. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2842–2852.
  19. Seo, D. I., J. C. Chae, K. P. Kim, Y. S. Kim, K. S. Lee, and C. K. Kim. 1998. A pathway for 4-chlorobenzoate degradation by *Pseudomonas* sp. S-47. *J. Microbiol. Biotech.* **8**: 96–100.
  20. Zaitsev, G. M., T. V. Tsoi, V. G. Grishenkov, E. G. Plotnikova and A. M. Boronin. 1991. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepeidonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 171–176.

(Received Dec. 3, 2001/Accepted Feb. 4, 2002)