

Comamonas sp. Strain DJ-12 의 재동정 및 4-Chlorobiphenyl 분해유전자 *pcbABC2D2* 의 분석

이준훈 · 박동우 · 강철희 · 채종찬 · 이동훈 · 김치경*

충북대학교자연대미생물학과 · 바이오연구소

4-chlorobiphenyl (4CB)의 분해균주인 *Pseudomonas* sp. strain DJ-12의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 *Comamonas* sp. strain DJ-12로 재분류 되었다. *Pseudomonas* sp. strain DJ-12로부터 4CB의 분해결과 생성되는 2,3-dihydroxybiphenyl을 계속 분해하는데 관여하는 *pcbC1D1* 유전자를 이미 보고된 바 있다. 이번 연구에서는 *Comamonas* sp. strain DJ-12로부터 4CB 분해에 관여하는 *pcbABC2D2* 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. *PcbAB* 및 *pcbCD* 유전자들의 염기서열은 48, 65%, 추정 아미노산 서열은 33, 42%의 낮은 유사도를 보였다. 본 연구에서 얻어진 *pcbC2D2* 유전자는 이미 보고한 *pcbC1D1* 유전자와 염기의 개수와 서열의 유사도가 서로 다름을 보여 주었다. *Comamonas* sp. strain DJ-12의 두 가지 *pcbCD* 유전자들은 Southern hybridization 결과에서도 유사성을 보이지 않았으며, 서로 다른 위치에 존재함을 보여주었다. 그러나 2,3-dihydroxybiphenyl의 분해 특성은 동일하였다. 이와 같은 결과는 *Comamonas* sp. strain DJ-12 균주가 2조의 *pcbCD* 유전자를 가지고 있다는 것을 의미하는 것이다.

Key words □ 4-chlorobiphenyl, *Comamonas* sp. DJ-12, degradation, *pcbABCD*

Polychlorinated biphenyls (PCBs)은 매우 안정적인 물질로서 현대산업에 폭넓게 사용되고 있다. 각종 산업에 이용되는 동안 자연계에 유입된 PCBs는 물에서의 용해도가 높고 휘발성이 낮은 특성을 갖고 있기 때문에, 토양이나 수질환경에서 잘 분해되지 않고 축적된다. 자연계에 오염된 PCBs는 인간을 포함하는 고등생물의 생식력을 감퇴시키고 돌연변이 또는 암을 유발할 수 있다(2, 9). 미생물에 의한 PCBs의 분해 정도는 biphenyl에 치환되어 있는 염소의 수와 위치에 따라 다양하며, 특히 염소의 수가 4개 이상의 PCBs는 거의 분해되지 않는 것으로 알려져 있다(12, 13). 그러나 한쪽 benzene 고리에 염소가 전혀 붙어 있지 않는 PCBs는 ring fission이 그 고리에서 쉽게 일어나 미생물에 의한 분해성이 높다고 한다. 이러한 이유 때문에 PCBs의 미생물에 의한 분해 연구는 4-chlorobiphenyl (4CB)에 대하여 많은 연구가 이루어졌다.

4CB의 분해는 *pcbA*와 *pcbB*의 산물인 4-chlorobiphenyl dioxygenase와 dihydrodiol dehydrogenase에 의하여 Fig. 1과 같이 2,3-dihydroxy-4-chlorobiphenyl (2,3-DHBP)로 변환된다.

4-chlorobiphenyl dioxygenase는 terminal dioxygenase (iron-sulfur protein), ferredoxin, 그리고 ferredoxin reductase의 세 부분으로 이루어져있다(4, 7, 16). 4-chlorobiphenyl dioxygenase를 암호화하는 유전자는 *pcbA*로서 모두 4 조각으로 구성되어진 multicomponent 유전자이다. Iron-sulfur protein의 large(α)와

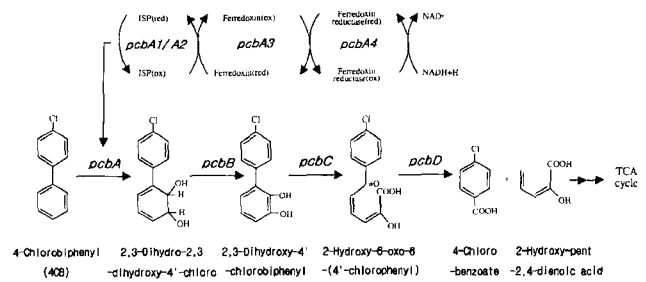


Fig. 1. Degradative pathway of 4-chlorobiphenyl and the genes involved in the degradation. ISP, iron sulfur protein; TCA, tricarboxylic acid cycle.

small(β) subunits을 암호화하는 *pcbA1*과 *pcbA2*, ferredoxin과 ferredoxin reductase를 각각 암호화하는 *pcbA3*와 *pcbA4*로 이루어져 있다.

그 후 2,3-DHBP는 다시 dioxygenase (*pcbC*의 산물)의 작용에 의해 산소 한 분자가 첨가되면서 벤젠고리의 1번과 2번 탄소위치에서 meta-cleavage 방법으로 개환이 일어나 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA:meta-cleavage product)로 변환된다(1, 6). 이 분해 산물은 *pcbD* 유전자의 산물인 hydrolase에 의해 4-chlorobenzoic acid (4CBA)와 2-hydroxy-penta-2,4-dienoate로 변환되어 TCA cycle로 들어가 완전히 분해된다.

이와 같은 4CB 분해에 관여하는 유전자의 클로닝 연구는 이미 여러 균주로부터 보고되었다. 본 연구실에서도 Kim 등(10)에 의해 *Pseudomonas* sp. strain DJ-12로부터 *pcbC1D1* 유전자가

*To whom correspondence should be addressed.
 Tel:043-261-2300, Fax: 043-264-9600
 E-mail: environ@chungbuk.ac.kr

클로닝 되었다. 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. strain DJ-12를 16S rDNA 분석을 통하여 *Comamonas* sp. strain DJ-12로 재분류하였고, *Comamonas* sp. strain DJ-12로부터 *pcbABC2D2* 유전자를 클로닝하였다. Kim 등 (10)에 의해 보고된 *pcbC1D1* 유전자와 본 연구에서 얻어진 *pcbC2D2* 유전자를 서로 비교분석하였다.

재료 및 방법

실험균주, 플라스미드 및 배양

본 실험에 사용된 4CB 분해균주로는 Kim 등 (11)에 의해 대전 공단지역 폐수로부터 분리된 *Comamonas* sp. strain DJ-12를 사용하였다. 형질 전환을 위한 숙주균으로는 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고, 클로닝 vector로 pGEM-T vector (Promega Co., USA)를 사용하였다. *Comamonas* sp. strain DJ-12는 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 배지에서 30°C로 배양하였다. 숙주인 *E. coli* XL1-Blue는 LB 배지에서 37°C로 배양하였다. 재조합 플라스미드를 함유한 *E. coli* XL1-Blue는 IPTG (400 mM)와 X-gal (20 mg/ml)을 포함한 LB 고체배지에서 37°C로 배양하였다.

16S rDNA의 염기서열 결정을 위한 PCR

Small subunit ribosomal DNA (16S rDNA) 유전자의 PCR 증폭은 XLTaq polymerase (GenenMed)를 사용하여 제조회사의 지침에 따라 PCR을 수행하였다. 유전자 증폭에 이용된 eubacterial primer는 27F (*E. coli* numbering 8-27; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492-1510; 5'-GGCTACCTTGTTCAGACTT-3')를 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 XLTaq polymerase 0.5 µl, primer mixture (50 pmol/µl) 1.0 µl, 10x ExTaq buffer 5 µl, 10x dNTPs 4 µl, 그리고 DW 39.5 µl를 넣어 Total 50 µl가 되게 한다. PCR 반응조건은 95°C에서 8분간 incubation 한 후 30 cycle을 수행한다. 각 cycle은 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 구성되며, 마지막 cycle이 끝난 후 72°C에서 10분간 방치하였다.

PCR 산물은 0.8% agarose gel을 이용하여 전기영동을 한 후 16S rDNA로 추정되는 band를 Quantum Prep™ Freeze 'N Squeeze DNA Gel extraction spin column (Bio-Rad, USA)을 사용하여 제조회사의 지침에 따라 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA는 pGEM-T vector (Promega Co., USA)에 ligation 시킨 후 숙주세포인 *E. coli* XL1-Blue에 Sambrook 등 (14)의 방법에 따라 형질 전환하였다.

Comamonas sp. DJ-12의 16S rDNA 염기서열의 GeneBank accession number는 AY600616이다.

PCR에 의한 *pcbABC2D2* 유전자 증폭

pcbABC2D2 유전자의 클로닝을 위하여 *pcbABC2D2* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer를 설계하였다. Primer 설계의 참고 염기서열은 *Comamonas* sp. strain DJ-12와 16S rDNA 염기서열 수준에서 가까운 균주인 *Comamonas testosteroni* TK102, 그리고

Pseudomonas sp. KKS102를 사용하였다.

PCR 반응은 1x 반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg · ml⁻¹ BSA, pH 8.3), 200 mM dNTP, 2.5 u의 XLTaq polymerase (GenenMed), 그리고 10 ng의 *Comamonas* sp. strain DJ-12 genomic DNA를 첨가하여 총 46 µl의 혼합물을 만들고, 반응액에 각각의 primer를 5 pM씩 첨가하여 진행시켰다. PCR 반응조건은 95°C에서 2분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다.

염기서열 결정 및 분석

염기서열을 결정하기 위해서 PCR products를 pGEM-T vector에 삽입하여 재조합 플라스미드를 만들었다. 재조합된 플라스미드 DNA를 sequencing의 template로 사용하였다. 재조합 플라스미드의 분리는 Wizard® Plus Minipreps (Promega Co., USA)을 이용하여 분리하였고, primer는 pGEM-T vector에 존재하는 T7, SP6 primer를 이용하여 벡터에 삽입된 유전자의 양방향으로부터 서열을 밝혔으며, 밝혀진 염기서열의 끝에서부터 새로운 sequencing primer를 합성하여 계속해서 염기서열을 결정해나가는 primer walking 방법을 사용하였다. Primer의 설계는 primer3 프로그램을 이용하여 길이는 20-mer, Tm은 52-54°C의 물리적인 조건을 맞추어 설계하였다. 설계된 primer는 (주)Bionex에서 합성하여 sequencing primer로 사용하였다. 염기서열의 결정은 (주)Bionex에 의뢰하여 결정하였다.

유전자의 염기서열 내 제한효소 위치와 open reading frame을 결정하기 위해 DNASIS software (Hitachi Ver. 7.06)를 이용하였고, GenBank database에서의 염기서열 검색은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 서버를 통해 BLAST 프로그램으로 수행하였다.

염기서열의 정렬 및 다중서열 정렬은 CLUSTAL W package (17)와 CLUSTAL X 프로그램 (18)을 이용하였으며, 이를 바탕으로 N-J method로 tree를 그렸으며 TreeView로 dendrogram을 그려 분석하였다.

Southern hybridization

Comamonas sp. strain DJ-12의 *pcbCD* 유전자는 본 연구실에서 이미 pCU1이라는 재조합 균주로 클로닝된 바가 있다 (10). 그러나 이번 실험에서 pCU1의 *pcbC1D1* 유전자 (10)와는 서로 다른 *pcbC2D2* 유전자를 얻었다. *Comamonas* sp. strain DJ-12 균주가 서로 다른 두 종류의 *pcbCD* 유전자를 지니고 있음을 확인하기 위해서 두 재조합 균주의 *pcbC* 유전자를 probe로 삼아 Southern hybridization을 실시하였다.

Comamonas sp. strain DJ-12의 genomic DNA를 제한효소로 처리하고, 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel을 0.25 M HCl에서 15~20분 처리하였고, 증류수로 gel을 세척한 후 denaturing solution에서 10분 동안 denaturation하였다. 다시 증류수로 gel을 세척한 후 neutralizing solution을 이용하여 5분 동안 중화하였다. Hybond N⁺ membrane (Amersham Bioscience, UK)으로

DNA의 전이는 Southern (15)의 방법을 원용하여 2시간 동안 실시하였으며, 전이 buffer로는 1N NaOH를 이용하였다. 전이가 끝난 membrane은 neutralizing solution에 1분간, 다시 20x SSC를 처리한 후에 80°C 로 건조시켰다. Prehybridization은 0.1 ml/m²의 비율로 ECL hybridization buffer를 첨가한 후 hybridization bag 으로 옮겨 42°C 에서 1시간 30분 동안 실시하였다. 여기에 제조된 DNA probe 60 µl를 첨가한 후 16시간 동안 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 후 primary washing buffer로 42°C 에서 20분간 2회 세척하고, 상온에 방치한 secondary washing buffer로 상온에서 5분간 2회 세척하였다. Detection reagent 1 ml을 1분간 처리한 후 제조회사의 지침에 따라 상동 DNA 절편을 확인하였다.

2,3-dioxygenase의 활성 측정

2,3-DHBP dioxygenase의 활성은 pCU1 또는 pCT4 클론을 함유한 *E. coli* DH10B를 LB-Cm 배지에서 log phase까지 배양한 세포를 원심분리 (Hanil, SUPRA22K, Korea)하여 수집한 다음 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 3번 washing한 뒤 sonicator (Fisher sonic dismembrator, Fisher Scientific Co., USA) 처리하여 (20 s pulse on and 40 s pulse off) 세포를 파쇄한 후 14,000 × g에서 15분간 원심분리한 상층액에서 측정하였다. 추출된 세포추출물에 2,3-DHBP을 기질로 첨가한 후 235 nm에서 2,3-DHBP의 감소를 측정하므로써 *bphC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

***Comamonas* sp. DJ-12의 재동정**

Comamonas sp. strain DJ-12의 16S rDNA 분석은 PCR을 이용하여 16S rDNA 부분을 클로닝하였고, 그 결과 1,496개의 염기서열을 밝혔다. *Comamonas* sp. strain DJ-12의 16S rDNA 염기서열을 GenBank database에서 유사도를 조사한 결과(Fig. 2) *Comamonas testosteroni* 종과 99%의 유사도를 보였다. 그리고 이미 보고된 다른 4CB 분해균주들의 16S rDNA 염기서열과 비교해 본 결과 *Comamonas testosteroni*를 제외하고는 *Pseudomonas* sp. KKS102 (6, 8)가 96%로 가장 높은 유사도를 보였다.

Comamonas sp. strain DJ-12은 Kim 등 (11)에 의하여 *Pseudomonas* strain DJ-12로 분류하였다. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition에 따르면 *Comamonas* 속이 1985년에 만들어지고, 1987년에 *Pseudomonas acidovorans*와 *Pseudomonas testosteroni*가 *Comamonas*로 재분류되었다고 하였다. *Comamonas* sp. strain DJ-12의 16S rDNA 염기서열을 알아본 결과 *Comamonas testosteroni* 종과 99%의 유사도를 나타내었다. 이를 바탕으로 DJ-12 균주를 *Comamonas* 속으로 동정하였고, 따라서 *Comamonas* sp. strain DJ-12로 명명하였다.

***pcbABC2D2*의 구조**

Comamonas sp. strain DJ-12의 genomic DNA를 주형으로 하

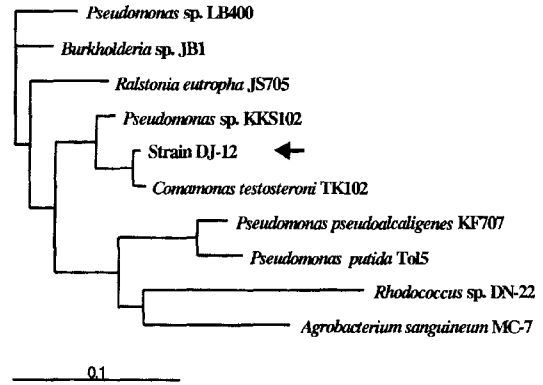


Fig. 2. Rooted neighbor-joining tree of several bacterial strains based on 16S rDNA sequences. Genbank number of the strains: U86373, *Pseudomonas* sp. LB400; X92188, *Burkholderia* sp. JB1; AF027407, *Ralstonia eutropha* JS705; D87103, *Pseudomonas* sp. KKS102; M11224, *Comamonas testosteroni* TK102; D87104, *Pseudomonas pseudoalkaligenes* KF707; AB008001, *Pseudomonas putida* Tol5; X89240, *Rhodococcus* sp. DN-22; AF186704, *Agrobacterium sanguineum* MC-7.

여 얻은 각각의 PCR 산물을 pGEM-T vector에 삽입하여 재조합 플라스미드 pCT1, pCT2, pCT3, pCT4, pCT5, 그리고 pCT6를 만들고 삽입된 PCR 산물의 염기서열을 결정하였다. 재조합 플라스미드 pCT1, pCT2, pCT3, pCT4, pCT5, 그리고 pCT6의 모든 삽입된 PCR 산물들의 염기서열 데이터를 정리·분석하여 9 kb 정도의 염기서열을 알 수 있었다. 만들어진 재조합 플라스미드들을 통하여 *pcb* 유전자가 *pcbF*, *Orf1*, *pcbA1*, *pcbA2*, *pcbA3*, *pcbB*, *pcbC*, *pcbD*, *Orf2*, *pcbA4* 의 순서로 되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). (Table 1).

Comamonas sp. strain DJ-12의 *pcbABC2D2* 유전자 염기서열 결과, 이미 알려진 균주인 *Pseudomonas* sp. KKS102 (6, 8)와 99%의 유사도를 보였다 (Table 2). 유전자의 배열 순서 또한 *pcbA1-A2-A3-B-C2-D2-Orf-A4*의 순서로 KKS102 (5, 8)와 동일한 배열을 보여주었다. 각 유전자의 ribosome 결합부위는 각 유전자를 인식하기 쉬운 위치에 존재하였다.

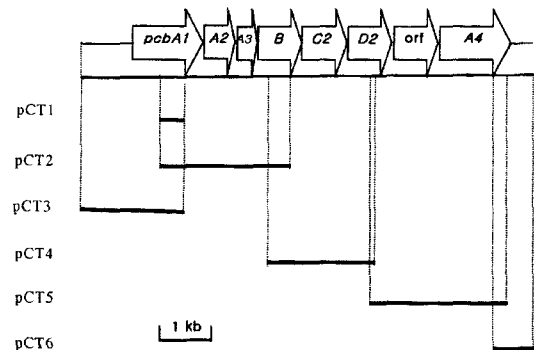


Fig. 3. Genetic structure of *pcbABCD* genes identified and cloned from the genomic DNA of *Comamonas* sp. strain DJ-12.

Table 1. Sequence structure of *pcbABCD* genes from *Comamonas* sp. strain DJ-12.

Gene	No. of nucleotide	No. of Amino acid	Terminal codon	G+C %	Putative ribosome binding site
pcbA1	1377	459	TGA	61	AGGA
pcbA2	582	194	TAA	59	AAGGAG
pcbA3	330	110	TGA	58	GAGGAA
pcbA4	1227	409	TGA	67	GAGTAA
pcbB	831	277	TAA	65	AGCGAG
pcbC	888	296	TGA	65	AAGGAG
pcbD	834	278	TGA	62	CAGGACA

Table 2. Amino acid sequence similarity of *PcbABCD* from *Comamonas* sp. strain DJ-12 compared with those of corresponding proteins from other strains

Strains	Similarity(%) of the genes						
	pcbA1	PcbA2	PcbA3	PcbA4	PcbB	PcbC2	PcbD2
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	-	-	-	-	-	33 (PcbC1)	42 (PcbD1)
<i>Pseudomonas</i> sp. KKS102	91 (BphA1)	87 (BphA2)	99 (BphA3)	83 (BphA4)	97 (BphB)	90 (BphC)	87 (BphD)
<i>Pseudomonas pseudoalkaligenes</i> KF707	72 (BphA1)	54 (BphA2)	72 (BphA3)	28 (BphA4)	72 (BphB)	58 (BphC)	-
<i>Pseudomonas</i> sp. LB400	72 (BphA)	54 (BphE)	72 (BphF)	28 (BphG)	72 (BphB)	72 (BphC)	54 (BphD)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	62 (TodC1)	44 (TodC2)	55 (TodB)	29 (TodA)	57 (TodD)	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. Cam-1	45 (BphA)	53 (BphE)	71 (BphF)	26 (BphG)	72 (BphB)	58 (BphC)	53 (BphD)
<i>Pseudomonas</i> sp. B4	45 (BphA)	54 (BphE)	-	-	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i> B-356	80 (BphA)	61 (BphE)	68 (BphF)	-	69 (BphB)	57 (BphC)	61 (BphD)
<i>Ralstonia oxalatica</i> A5	53 (BphA1)	75 (BphA2)	94 (BphA3)	79 (BphA4)	95 (BphB)	86 (BphC)	78 (BphD)
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	48 (BphA1)	75 (BphA2)	50 (BphA3)	28 (BphA4)	51 (BphB)	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp. M5	47 (BphC1)	45 (BphC2)	51 (BphB)	29 (BpdA)	62 (BphD)	-	-
<i>Rhodococcus globerulus</i> P6	38 (BphA1)	45 (BphA2)	51 (BphA3)	29 (BphA4)	-	-	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA421	28 (BphA1)	34 (BphA2)	29 (BphA3)	28 (BphA4)	43 (BphB)	28 (BphC)	34 (BphD)

Genbank number of the strains: D44550, *Pseudomonas* sp. DJ-12; D17319, *Pseudomonas* sp. KKS102; M83673, *Pseudomonas pseudoalkaligenes* KF707; M86348, *Pseudomonas* sp. LB400; J04996, *Pseudomonas putida* F1; AY027651, *Pseudomonas* sp. Cam-1; AJ251217, *Pseudomonas* sp. B4; U47637, *Comamonas testosteroni* B-356; D17319, *Ralstonia oxalatica* A5; AB048706, *Rhodococcus* sp. RHA1; U27591, *Rhodococcus* sp. M5; X80041, *Rhodococcus globerulus* P6; D88021, *Rhodococcus erythropolis* TA421.

*pcbC1D1*과 *pcbC2D2*의 확인

본 연구팀은 이미 *pcbCD* 유전자에 관한 선행연구를 수행한 바가 있다 (10). 재조합 플라스미드 pCU1의 6.4 kb 짜리 삽입 DNA 조각 내부에 *pcbD-pcbC*의 순서로 유전자가 배열되어 있음이 보고 되었다.

pCU1 클론의 *pcbC1*과 *pcbD1* 유전자 (10)는 pCT4와 pCT5의 *pcbC2D2*와는 염기의 개수도 다르며 유사도 또한 48, 65%로 많은 차이를 보였다. 한 가지 공통점은 두 *pcbC* 유전자가 모두 노란색의 대사산물을 생성하는 *meta-cleavage*에 관여한다는 것이다. *pcbCD*를 포함하는 pCU1 과 pCT4의 형질전환체에 대하여 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP)의 분해력을 비교실험한 결과는 Table 3에서와 같이 비슷하였다.

두 가지의 서로 다른 *pcbC* 유전자를 probe로 삼아 Southern hybridization을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. 그 결과 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 genomic DNA를 제한효소 *Bam*HI으로 절단한 lane에선 *pcbC2*가 6.5 kb에서, *pcbC1*은 9.4 kb 부근에서

Table 3. Degradation activity of 2,3-dihydroxybiphenyl by pCU1 and pCT4 clones carrying *pcbC1D1* and *pcbC2D2* genes, respectively

Clone	Degradation of 2,3-DHBP (A236) at time (sec):					
	0	10	30	60	120	180
pCU1	3.02	1.12	0.48	0.35	0.12	0.10
pCT4	3.06	1.31	0.54	0.42	0.18	0.14

Southern signal을 보였다.

제한효소 *Cla*I으로 절단한 lane에선 *pcbC2*가 10 kb, *pcbC1*은 6 kb 부근에서 Southern signal을 보였다. 제한효소 *Eco*RI으로 절단한 lane에선 *pcbC2*가 23 kb, *pcbC1*은 9 kb 부근에서 Southern signal을 보였다.

이번 실험에서 *Comamonas* sp. strain DJ-12가 서로 다른 두 종류의 *pcbCD* 유전자를 가지고 있음을 염기서열의 비교와 Southern hybridization 결과를 통해서 확인하였다. 이에 대하여

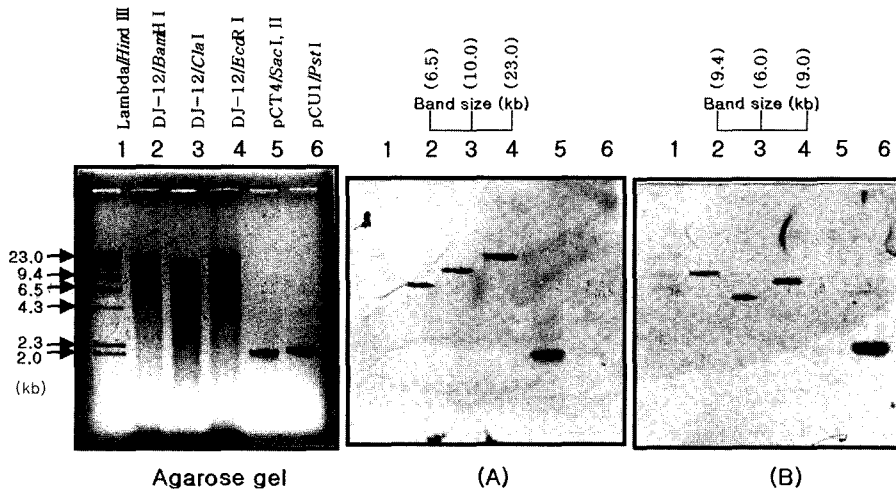


Fig. 4. Agarose gel of the genomic DNA fragments of *Comamonas* sp. strain DJ-12 and their Southern blot using *pcbC* genes in pCT4 (A) and pCU1 (B) as the DNA probe.

Asturias 등 (3)은 그람 양성 세균인 *Rhodococcus globerulus* P6에서 세 가지의 서로 다른 2,3-DHBP dioxygenase (*bphC* 유전자 산물)를 클로닝하였고, 이들이 Southern hybridization 결과 서로 유사성을 보이지 않았다고 보고된 바 있다. *Rhodococcus globerulus* P6는 *Comamonas* sp. strain DJ-12와 마찬가지로 *meta*-cleavage를 통해서 4CB를 분해한다. *Rhodococcus globerulus* P6는 cosmid library를 구축한 후, 2,3-DHBP를 분무했을 때 노란색을 띠는 콜로니들을 선별하여 세 가지 *bphC* 유전자 (*bphC1*, *bphC2*, *bphC3*)를 획득하였다. 각각의 *bphC* 유전자는 서로 다른 cosmid 클론에 포함되어 있었으며 모두 *meta*-cleavage에 관여함이 확인되었다. 이와 같이 하나의 균주에서도 서로 다른 세가지의 2,3-DHBP dioxygenase가 존재할 수 있고 4CB의 분해에 있어 세가지의 다른 분해경로가 가능할 뿐 아니라 각 분해유전자들은 서로 다른 환경조건에 의하여 발현된다고 하였다. 이처럼 동일한 기능을 갖는 여러 isoenzyme의 존재는 2,3-DHBP를 비롯하여 catechol과 protocatechuate 등 *Comamonas* sp. strain DJ-12가 넓은 기질 특이성을 보여주는 이유라고 생각이 된다.

감사의 말

본 연구는 한국 과학재단의 특정기초 연구비(R01-2002-000-00022-0)에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi, and R. Masse. 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorobiphenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the *meta*-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1375-1385.
- Asturias, J. A., L. D. Eltis, M. Prucha, and K. N. Timmis. 1994. Analysis of three different 2,3-dihydroxy biphenyl-1,1-dioxygenase found in *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Biol. Chem.* 269,

- 7807-7815.
- 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.
- Erickson, B. D., and F. J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent PCB-degrading enzyme in *pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174, 2903-2912.
- Fukuda, M., Y. Yasukouchi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi, and K. Yano. 1994. Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Cell Mol. Biol. Res.* 202, 850-856.
- Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki, 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.
- Haddock, J. D., L. M. Nadim, and D. T. Gibson. 1993. Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 175, 395-400.
- Kikuchi, Y., Y. Nagata, M. Hinata, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1994. Identification of the *bphA4* gene encoding ferredoxin reductase involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176, 1689-1694.
- 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.
- Kim, E., Y. Kim, and C. K. Kim. 1996. Genetic structures of the genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase and 2-hydroxy-6oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid hydrolase from biphenyl- and 4-chlorobiphenyl- degrading *Pseudomonas* sp. strain DJ-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 262-265.
- Kim, J. W., C. K. Kim, Y. C. Kim, J. H. Yeoum, and J. G. Lee. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *J. Microbiol.* 25, 122-128.

12. Pittman, C. U. and J. He. 2002. Dechlorination of PCBs, CAHs, herbicides and pesticides near and in soils at 25 using Na/NH₃. *J. Hazard. Materials* 2790, 1-12.
13. Providenti, M. A., and R. C. Wyndham. 2001. Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the *cbaABC*-encoded chlorobenzoate catabolism pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3530-3541.
14. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
15. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-17.
16. Taira, K., J. Hirose, S. Hayashida, and K. Furukawa. 1992. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.* 267, 4844-4853.
17. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673-4680.
18. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24, 4876-4882.

(Received 20 May, 2004/Accepted 15 June, 2004)

ABSTRACT : Reidentification of *Comamonas* sp. Strain DJ-12 and Analysis of its *pcbABC2D2* Genes Responsible for Degradation of 4-Chlorobiphenyl.

Jun-Hun Lee, Dong-Woo Park, Cheol-Hee Kang, Jong-Cha Chae, Dong-Hun Lee, and Chi-Kyung Kim* (Departement of Microbiology and Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Comamonas sp. strain DJ-12 is a 4-chlorobiphenyl(4CB)-degrading bacterium that was reidentified from *Pseudomonas* sp. DJ-12. The genomic DNA was isolated from the strain DJ-12 and amplified by PCR with primers for cloning *pcbABCD* genes responsible for degradation of 4CB. The amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of *pcbA1*, *pcbA2*, *pcbA3*, *pcbA4*, *pcbB*, *pcbC2*, and *pcbD2* genes showed 91, 87, 99, 87, 97, 90 and 87% homologies with those of *Pseudomonas* sp. KKS102, respectively. The *pcbC1D1* genes that are involved in the degradation of (4-chloro)1,2-dihydroxybiphenyl produced from 4CB by *pcbAB* gene products were previously reported in the recombinant plasmid pCU1 from *Pseudomonas* sp. DJ-12. However, the *pcbC2D2* genes in the plasmid pCT4 and pCT5 cloned from *Comamonas* sp. DJ-12 in this study showed 51 and 62% homologies with those of *pcbC1D1* in their nucleotide sequences. The *pcbC1D1* and *pcbC2D2* genes were found by Southern hybridization to be located at different loci on the chromosome of DJ-12 strain. These results indicate that *Comamonas* sp. strain DJ-12 has two different sets of *pcbCD* genes responsible for degradation of (4-chloro)1,2-dihydroxybiphenyl.