

Pseudomonas putida BCNU171의

유기용매 내성 및 toluene 내성 관련 유전자의 클로닝

주우홍, 김순정, 이호원*, 최승태**, 정영기***

창원대학교 생물학과, 경남대학교 생명과학부*, 창원대학교 유전공학연구소**,
동의대학교 미생물학과***

전화 (055) 279-7443, FAX (055) 279-7449

Abstract

Pseudomonas putida BCNU171 had the tolerant ability to several other organic solvents headed by toluene and xylene. Several mutants were made by mating of BCNU171, pJFF350 to clarify the structure tolerance gene related. From this mutants the 7 of mutants related with toluene sensitive mutants were selected. pBCNUT-2, pBCNUT-4, pBCNUT-9 was transformed, and from this separated plasmid DNA sequences the gene having high homology was searched. In the case of toluene sensitive mutant it was *todX* gene (pBCNU4) related with cell membrane, *ttgE* gene (pBCNU2, pBCNU9) and *ttgF* gene (pBCNU2, pBCNU9).

서 론

무색 투명의 액체인 toluene은 생물에게는 매우 유독하여 0.1%(v/v)의 농도로도 거의 모든 미생물들을 죽일 수 있고, 발암의 원인이 될 수도 있다¹⁾. 또한 세포막에 작용하여 세포 내 독성을 나타낸다고 일반적으로 알려져 있다²⁾. Toluene의 세포독성에 관한 구체적인 연구에서는 toluene이 유입된 그람음성균의 경우 세포막이 lamella 이중 층 모양에서 육각형 모양으로 변화됨으로 내막을 파괴시키고 결국 이온과 단백질을 누출시켜 세포막의 potential을 붕괴시킨다고 보고하였다³⁾⁴⁾. 하지만 toluene과 같은 유기용매에 대한 내성을 갖는 미생물도 있어 관심의 대상이 되고 있다. 특히 이들 내성균주에 대한 연구는 *Pseudomonas* 속을 대상으로 활발히 연구되고 있으며, 이들 균주의 고농도 유기용매 내에서의 생존 기작에 대한 연구는 활발히 진행되어 현재까지 세포막에 대한 연구³⁾, 고농도의 toluene과 유기용매 내성에 관한 연구⁵⁾⁶⁾, 방향족 화합물의 배출 활성화에 관한 연구⁵⁾ 등이 보고되고 있다. 이와 관련된 대부분의 연구는 극소수의 대표 균주에 국한되어 있는 반면 BTEX 및 naphthalene의 분해 가능성에 대해서는 아직 알려지지 않고 있으며, 유기용매 내성 기작에 대한 연구도 단편적이고 그 이용이나 관련 유전자의 해명도 진전이 없는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 *Pseudomonas putida* BCNU171 균주를 이용하여 실제 자연 환경에 적응할 수 있는가에 대한 가능성을 판단하기 위한 기초 실험으로 각종 유기용매에 대한 내성부터 확인한 후, 단편적으로 알려져 있는 toluene에 대한

내성 기작을 규명하고자 했다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

사용 균주는 *Pseudomonas putida* BCNU171이며, donor cell은 *Escherichia coli* S17-1(pJFF350)과 각각의 toluene 내성 변이주의 형질전환에 이용되는 균주로는 *E. coli* DH-5 α (competent cell)균을 사용하였다. 배지로는 Luria Bertani(LB)와 Mineral Salt Medium(MSB)⁷⁾을 사용하였다.

2. Mating 및 toluene 내성 변이주의 선별

BCNU171과 pJFF350의 colony를 혼합하여 mating이 될 수 있도록 37°C에서 배양하고 이를 다시 kanamycin(40 μ g/ml)과 ampicillin(50 μ g/ml)을 넣은 LB배지에 spreading하여 mating 유무를 판단하였다. mating된 변이주를 이용해 toluene을 증충한 LB(Km) plate에서 자라지 않은 colony를 찾아 toluene 내성 변이주로 간주하였다.

4. 변이주의 chromosomal DNA 추출, ligation 및 transformation

Toluene 내성 변이주를 형질전환시키기 위하여 각각의 변이주 chromosomal DNA를 Thomas 등의 방법을 modification한 방법으로 추출하였다⁸⁾. 변이주들의 DNA를 취해 *EcoR* I으로 처리한 뒤 이들의 chromosomal DNA를 self ligation시켰다. Ligation mixture인 DNA에 competent cell을 혼합배양 후 LB plate(Km, 40 μ g/ml)에 spreading하여 37°C에서 18시간 배양하였다.

5. Plasmid DNA의 추출 및 Omegon-Km insertion site 분석

형질전환된 단일 colony를 취해 LB(Km, 40 μ g/ml) plate에 도말하고 Lee and Rasheed⁹⁾와 같은 방법으로 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA는 *EcoR* I, *Bam*H I, *Hind*III로 절단하여 형질전환된 각각의 변이주의 plasmid를 pJFF350과 비교하여 Omegon-Km의 삽입 유무를 전기영동으로 확인하였다.

6. 변이주의 sequencing

Cloning된 plasmid들(7종류)을 Omegon-Km 삽입 부위의 flanking region을 sequencing하기 위하여 cloning된 plasmid를 Omg-11(5'-ACCCAGCCTGCGCGA GCAGGGGAAT-3')과 Omg-21(5'-AATTCTAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3') primer로 sequencing하였으며, NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST에서 homology를 검색하고 EMBL(European Molecular Biology Laboratory)에서 toluene 내성에 관련된 기존의 균주(*P. putida* Y19106)와 nucleotide alignment했다.

결과 및 고찰

1. 유기용매에 대한 내성

P. putida BCNU171은 toluene, *o*-xylene, *p*-xylene, *m*-xylene, *n*-hexane, heptanol, phenol, cyclohexane 및 propylbenzene에 대한 내성은 가지고 있지만 benzene,

ethylbenzene, trichloroacetic acid, trichloroethylene, pentachlorophenol, naphthalene, *p*-dichlorobenzene 및 monochloroacetic acid에 대한 내성은 없었다(Table 1). 특히 *p*-, *m*- 및 *o*-xylene에 대한 내성과 phenol(8mM)에 대한 내성은 주목할 만한 결과이다.

2. Toluene 내성 변이주

Toluene 내성 변이주로 선별된 7개의 변이주들(Table 2)을 가지고, 반복된 toluene 내성 실험 결과 재현성이 있는 변이주는 pBCNUT2, pBCNUT4, pBCNUT9였다. 이들 변이주는 두개의 primer가 DNA를 양쪽으로 읽어 주어 염기서열의 정보는 확보되었으며, Omegon-Km의 inverted repeat가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다. NCBI에서 homology를 검색한 결과, 감수성 변이주 중 pBCNU4의 경우 *todX* gene (membrane protein, unknown function)이 homology가 높았다. 나머지 두 변이주들(pBCNU2, pBCNU9)은 inner membrane transporter (*ttgE* gene)와 outer membrane channel protein (*ttgF* gene)에 관여하는 gene이었다.

Table 1. Tolerance to organic solvents by strain BCNU171 in LB plate.

Organic solvents	BCNU 171	Organic solvents	BCNU 171
Toluene	+	Benzene	+
<i>o</i> -xylene	+	Ethylbenzene	-
<i>p</i> -xylene	+	Trichloroacetic acid	-
<i>m</i> -xylene	+	Trichloroethylene	-
<i>n</i> -Hexane	+	Pentachlorophenol	-
Heptanol	+	<i>p</i> -Dichlorobenzene	-
Phenol	+	Monochloroacetic acid	-
Cyclohexane	+	Naphthalene	-
Propylbenzene	+		

Table 2. Toluene sensitive mutant of *P. putida* BCNU171.

Mutant cells	Markers	Related toluene sensitive gene
TMT-1(318)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	
TMT-2(502)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	<i>ttgE</i> gene, <i>ttgF</i> gene
TMT-4(1013)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	<i>todX</i> gene
TMT-9(1104)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	<i>ttgE</i> gene, <i>ttgF</i> gene
TMT-10(1105)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	
TMT-11(1106)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	
TMT-12(1107)	Ap ^R Km ^R Tol ^S	

※ Ap^RKm^R is resistance cells to ampicillin and kanamycin. Tol^S is sensitivity cells to toluene.

요약

P. putida BCNU171 균주를 이용하여 toluene 및 다양한 유기용매에 대한 내성을 조사하고 미생물의 어떤 기작을 통하여 toluene에서 내성을 갖는지를 밝히기 위해 유전자들의 발현 양상을 알아보았다. 그 결과 BCNU171은 toluene 및 xylene(*m*-, *p*- 및 *o*-xylene)을 비롯하여 다양한 유기용매에 내성을 나타냈다.

한편 toluene의 내성 유전자들의 발현 양상을 밝히기 위한 과정에서 mating된 변이주는 7개였고 그 중 형질전환된 균주는 pBCNUT2, pBCNUT4, 그리고 pBCNUT9였다. 이들의 DNA를 sequencing하여 염기서열을 밝힌 결과 toluene 내성에 관련된 gene은 *todX* gene, *ttgE* gene 그리고 *ttgF* gene인 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Dean, B. J. 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res.* 145: 153-181.
2. Tsitko, I. V., G. M. Zaitsev, A. G. Lobanok and M. S. Salkino-Solonen. 1999. Effect aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rodococcus opacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 858-855.
3. Sikkema J., J. A. M. de Bont and B. Poolman. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol.* 59: 201-222.
4. de Smet, M. J., J. Kingma and B. Without. 1978. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 506: 64-80.
5. Mosqueda, G. and J. L. Ramos. 2000. A set of genes encoding a s e c o n d toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* 182: 937-943.
6. Lee. S. K. and S. B. Lee. 2001. Isolation and Characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 1-12.
7. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni and M. Doudoroff. 1996. The aerobic *Pseudomonas*: taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
8. 성문희. 1994. 제 2판 분자생물학노트. KIST유전공학연구소. pp. 33-36.
9. Lee, S. and S. Rasheed. 1990. A simple for maximum yield of High-Quality plasmid DNA. *Bio. Techniq.* 9: 676-679.