

4-Chlorobenzoic Acid 분해유전자의 클로닝과 유전학적 특성

이익근 · 김종우 · 김치경
충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Cloning and Characterization of the Genes Responsible for Degradation of 4-Chlorobenzoic Acid

Lee, Ik-Keun, Jong-Woo Kim and Chi-Kyung Kim

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

ABSTRACT: A bacterial isolate of DJ-12 capable of degrading 4-chlorobenzoic acid (4CBA) as well as 4-chlorobiphenyl (4CB) was used in this study. Its biodegradability of 4CBA was tested and the location of the genes coding for degradation of 4CBA was investigated by the method of *in vivo* cloning. The genes were found to be existed in the plasmid of pDJ121 which is about 65 kb in size and which has 9, 11, 10, and 19 restriction sites for *EcoRI*, *HindIII*, *SalI*, and *PstI*, respectively. The hybrid plasmid of pDK450 was constructed by ligation of the *EcoRI* fragments of pDJ121 with pKT230 as a vector. In the recombinant cells selected through transformation of the hybrid vector into *Pseudomonas putida* KT2440, the 4CBA-degrading genes of DJ-12 were proved to be cloned and expressed in the *Pseudomonas* sp.

KEY WORDS: Biodegradation of 4CBA, 4CBA-degrading genes, Cloning

여러 가지 산업제품의 제조과정에는 수 많은 종류의 유기화학물질들이 사용되고 있으며, 이들 중의 많은 것들은 사용과정을 통하여 자연계에 유출된 후 종국적으로는 하천수나 호수와 같은 지표수나 토양으로 유입·오염되고 있다. 이렇게 오염된 유기화학물질들은 자연계에서 물리·화학적인 반응에 의하여 변환되거나 또는 미생물의 효소적 반응에 의하여 변환된다. 이와 같이 환경미생물에 의한 효소작용은 그 물질의 구조에 변화를 일으켜 보다 간단한 물질로 분해하는 것이다. 특히 토양이나 하수에 오염된 유기물질을 분해하는 미생물들은 그 분해과정을 통하여 발생하는 에너지를 자신의 생합성과정에 사용할 뿐더러, 구성성분으로 필요한 탄소원을 획득하는 것이다. 그러므로 유기물질로 오염된 자연환경에서 이러한 미생물들은 환경의 정화 및 보존에 기여할 뿐만 아니라, 물질의 재순환에 중요한 역할을 담당하고 있는 것이다.

Chlorinated biphenyl 을 비롯하여 여러 가지 chlorinated aromatic hydrocarbon 물질들이 자연

계에 오염될 때에는 미생물에 의한 분해성이 낮을 뿐더러 독성을 나타낸다는 점에서 환경학적으로나 보건학적으로 많은 주목을 받게 되는 오염물질이 되는 것이다. 그러나 4-chlorobiphenyl(4CB)을 비롯한 chlorinated biphenyl 들은 자연계에서 분해속도는 느리지만, 어떤 종류의 미생물에 의하여 dihydrodiol compound 와 dihydroxy biphenyl 등의 중간대사산물을 거쳐 chlorobenzoic acid 로 분해된다. Chlorobenzoic acid 는 다시 catechol 이나 protocatechuate 로 분해된 다음 beta-ketoadipate pathway 에 따라 succinate 등으로 분해된다는 것이 보고되었다(Doten 등, 1987). 염소를 하나만 가지고 있는 4CB 나 4CBA 또는 3-chlorobenzoic acid(3CBA) 를 분해하는 세균들에 있어서는 분해에 관련된 유전자들이 pP6, pM5, pCB1, pSS50 또는 pAC27 등과 같은 plasmid DNAs 에 존재한다는 것이 Furukawa 와 Chakrabarty(1982), Shield 등(1985), Franz Chakrabarty(1987), 그리고 Blake 와 Hegeman

(1987)에 의하여 밝혀졌다. Furukawa와 Chakrabarty(1982)는 *Acinetobacter* sp.와 *Pseudomonas putida*를 혼합배양함으로써 4CB를 완전분해할 수 있었다고 보고하였다. 이와 같은 4CB의 분해에 관여하는 유전자들은 3개의 분리된 유전자군으로 나뉘어져 있었는데, 그 중 한 유전자군은 *Acinetobacter* sp.의 pKF1 plasmid에 존재하고 있음이 확인되었으며 나머지 두 유전자군은 TOL transposon과 *P. putida*의 plasmid pAC25에 존재한다는 것이 밝혀졌다. 그 외에는 4CBA 및 4CB 분해유전자의 특성이나 cloning 등에 관한 연구가 별로 보고된 바 없었다.

그러므로 본 연구에서는 이미 자연계로부터 분리·확보하고 있는 4CBA 및 4CB 분해균주(Kim 등, 1987)를 시험균주로 사용하여 이들의 분해특성 등을 조사하였다. 또한 4CBA 분해에 관여하는 유전자가 plasmid DNA에 존재함을 확인하였고, pKT230을 vector로 사용하여 4CBA 분해유전자를 *P. putida* KT2440에 molecular cloning을 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 4CBA 및 4CB 분해균주는 이미 본 연구실에서 분리·확보하고 있는 분해균주들 중 분해능이 우수한 DJ-12 균주를 사용하였다. DJ-12는 Kim 등(1987)에 의하여 *Pseudomonas* sp.로 동정 보고된 바 있다. DJ-12 균주의 4CBA 분해유전자를 cloning 하는데 필요한 host는 *Pseudomonas putida* KT2440을 사용하였다. 모든 균주들을 증식시킬 때나 분해능을 검정할 때에는 MM2 최소배지(Kiyohara 등, 1982)를 사용하였고, 필요에 따라 Luria-Bertani(LB) 완전배지도 사용하였다. 각 배지의 조성 및 제조방법은 이미 발표된 논문(Kim 등, 1986; Kim 등, 1987)에서 기술한 바와 같다.

분해능 검정

고체배지에서의 4CBA 분해능 검정은 Kiyohara 등(1982)과 Sylvestre(1980)의 방법으로 실시하였으며, 액체배지에서의 4CBA 분해능은 Furukawa 등(1976, 1978)의 방법에 따라 검정하였다. 각각의 시험균주는 4CBA 또는 4CB를 단일탄소원으로 첨가한 MM2 액체배지에서 배양하면서 일정시간별로 배양액을 채취하여 pore size가 0.2 μm 인 membrane filter로 여과한 후, 그 여액을 UV-spectrophotometry로 검정하였다.

분해 plasmid의 확인

DJ-12 균주를 donor로, *P. putida* KT2440을 recipient로 사용하여 Nakazawa와 Yokota(1977)의 방법에 따라 conjugation 시킴으로서 *in*

in vivo cloning을 실시하였다. Transconjugants들은 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 chloramphenicol(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 4CBA(1mM)를 첨가한 MM2 고체배지에서 counter-selection 방법으로 선발하였다. Donor와 transconjugants들의 plasmid를 분리하여 전기영동방법으로 비교·검토함으로써 4CBA 분해유전자가 plasmid에 존재하는지를 확인하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 molecular cloning

DJ-12 및 transconjugants와 cloned cell 등로부터 plasmid DNA를 분리하는 방법은 Birnboim과 Doly(1979)의 alkaline lysis 방법을 따랐다. 제한효소의 처리는 효소 구입처인 Promega(Madison, Wisconsin, U.S.A.)의 enzyme manuals에 따라 수행하였다. 4CBA 분해유전자는 pKT230을 vector로 사용하여 *P. putida* KT2440에 molecular cloning 하였으며, 이 과정에서 이용한 ligation과 transformation 그리고 전기영동 등은 기본적으로 Silhavy 등(1984)의 방법을 따랐다.

결과 및 고찰

각 균주의 4CBA 분해능

DJ-12 균주와 함께 transconjugants들에 대하여 4CBA 및 4CB 그리고 그 대사산물의 분해양상을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 대부분의 transcon-

Table 1. Degradation of 4CBA and its metabolites, and antibiotics responses of the bacterial isolates and transconjugants

Bacterial strains	Degradation				Antibiotics* responses		
	4CB	4CBA	4OHBA	PCA	CAT	Sm	Cm
DJ-12	++	+++	+++	+++	-	S	S
KD121	+	+++	+++	+++	+	R	R
KD122	+	+++	+++	+++	+	R	R
KD123	+	++	+++	+++	+	R	R
KD124	+	++	+++	+++	+	R	R
KD125	++	+++	+++	+++	+	R	R
KD126	++	++	+++	+++	+	R	R
KD127	++	+++	+++	+++	+	R	R
<i>P. putida</i>							
KT2440	-	-	+	+	+	R	R

Symbols: 4CB, 4-chlorobiphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoic acid; 4OHBA, 4-hydroxybenzoate; PCA, protocatechuate; CAT, catechol.

*Sm(streptomycin) and Cm(chloramphenicol) responses were tested at concentration of 100 and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

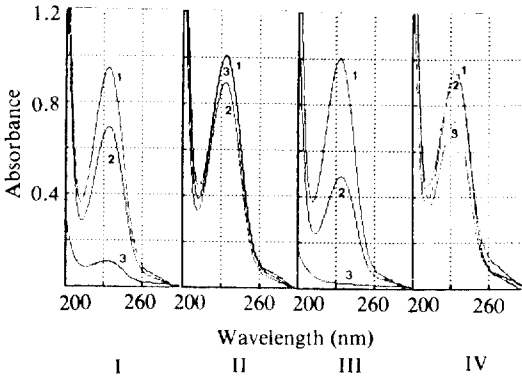


Fig. 1. UV-scanning spectra of 4CBA and its metabolites produced by the strains of DJ-12(II), *P. putida* KT2440(III), KD-125(III), and 4CBA⁻ mutant(IV). 1, 2 and 3 represent the samples of 0, 2 and 5 days cultures, respectively.

jugants들은 donor인 DJ-12 균주에 비하여 4CBA의 분해양상이 거의 동일하였으나 KD-121~KD-124의 분해능은 조금 떨어졌다. 4CBA 분해능을 UV-spectrophotometry로 측정된 결과는 Fig.1에서와 같이 wild type인 DJ-12와 transconjugant KD-125는 3일 배양 후 4CBA가 모두 분해된데 비하여 4CBA⁻ mutant는 recipient로 사용한 *P. putida* KT2440과 함께 4CBA의 분해능이 전혀 나타나지 않았다.

4CBA 분해 plasmid의 특성

DJ-12 균주와 transconjugants들로부터 plasmid DNA를 추출하여 전기영동한 결과는 Fig.2와 같다. 대부분의 transconjugants들은 DJ-12가 함유하는 plasmid 중 가장 큰 pDJ121(화살표)를 획득하고 있었다. 이와 같은 결과로부터 DJ-12 균주가 함유하는 plasmid 중 가장 큰 pDJ121에 4CBA 및 4CB 분해에 관여하는 유전자가 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

이와 같이 chlorinated hydrocarbon의 분해 plasmid가 conjugation에 의하여 쉽게 전이된다는 사실에 대해서는 Don과 Pemberton(1981)과 Vandenberg 등(1981)에 의해서도 이미 보고된 바 있다. 그러나 transconjugant KD-127는 DJ-12나 다른 transconjugants들과는 달리 새로운 2개의 plasmid를 포함하고 있었다. 이는 DJ-12균주가 가지고 있던 pDJ121 plasmid가 conjugation되는 동안에 2개의 plasmid로 분리되었음을 암시해주고 있다. 이와 같은 현상에 대해서는 Jeenes 등(1982)과 Carney와 Leary(1989)가 보고한 바 있고, 특히 KD-127 가지고 있는 2개의 plasmid 중 작은 plasmid의 copy 수가 많아진 사실은 meta-chlor-

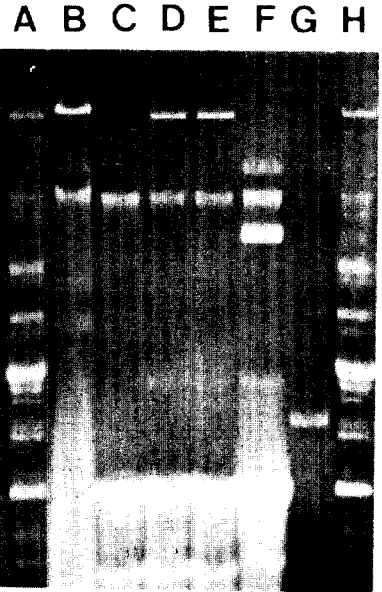


Fig. 2. Agarose gel electrophoretogram of plasmids in the bacterial isolates and transconjugants. Lane A and H, *E. coli* V517; B, DJ-12; C, *P. putida* KT2440; D, KD-125; E, KD-126; F, KD-127; G, pBR322. Arrow indicate the plasmid pDJ121 that encodes the 4CBA and 4CB-degrading genes.

A B C D E F G H I J K L

Fig. 3. Agrose gel electrophoretogram of restriction endonuclease digestion of the pDJ121. Lanes A λ -HindIII; B, pDJ121-EcoRI; C, pDJ121-EcoRI-PstI; D, pDJ121-PstI; E, pDJ121-PstI-XhoI; F pDJ121-XhoI; G, pDJ121-XhoI-BstEII; H, pDJ121-BstEII; I, pDJ121-EcoRI-BstEII; J, pDJ121-EcoRI-XhoI; K pDJ121-PstI-BstEII; L, λ -HindIII-EcoRI.

Table 2. Fragments of the plasmid pDJ121 after digestion with restriction endonucleases

Fragment No.	Fragments size (kb)			
	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>SalI</i>	<i>PstI</i>
1	23.0	16.5	11.5	9.6
2	10.0	10.0	10.0	8.6
3	9.0	9.0	9.7	5.8
4	7.5	5.0	9.4	5.5
5	5.3	3.8	7.0	5.0
6	3.6	3.0	5.0	4.0
7	2.5	2.5	4.2	3.6
8	1.9	2.4	4.0	3.0
9	0.5	2.1	1.6	2.8
10		1.8	0.9	2.6
11		1.2		2.3
12				2.2
13				2.1
14				1.94
15				1.58
16				1.3
17				0.9
18				0.5
19				0.1
Total size:	about 65 kb			

obenzoate의 분해능이 특정 DNA의 amplification 또는 deamplification에 관계있다고 발표한 Rangneker(1988)의 보고내용과 연관있는 것으로 생각할 때 매우 주목되는 바이다.

4CBA 및 4CB를 분해하는 DJ-12 균주로부터 pDJ121 plasmid를 순수분리한 후 *EcoRI*, *HindIII*, *SalI* 그리고 *PstI* 등의 제한효소로 단독 또는 혼합처리하여 그 절단양상을 확인한 결과는 Fig.3 및 Table 2에서와 같다. pDJ121에는 *EcoRI* 인식부위가 9개, *HindIII* 부위가 11개, *SalI* 부위가 10개 그리고 *PstI* 부위가 19개인 것으로 확인되었고, pDJ121의 크기는 약 65 kb 정도로 추정되었다.

4CBA 분해유전자의 cloning

Plasmid pDJ121을 *EcoRI*으로 처리하여 얻은 절편을 broad host range의 특성을 가지고 있는 cloning vector인 pKT230에 ligation시킴으로서 재조합 plasmid인 pDK450을 Fig.4에서와 같이 제조하였다. 이와 같이 제조한 pDK450을 4CBA 분해능이 없는 *P. putida* KT2440에 transformation하여 얻은 cloned cell에서는 4CBA에 대한 분해능이 잘 발현되었고, 이들로부터 DNA를 추출하여 전기영

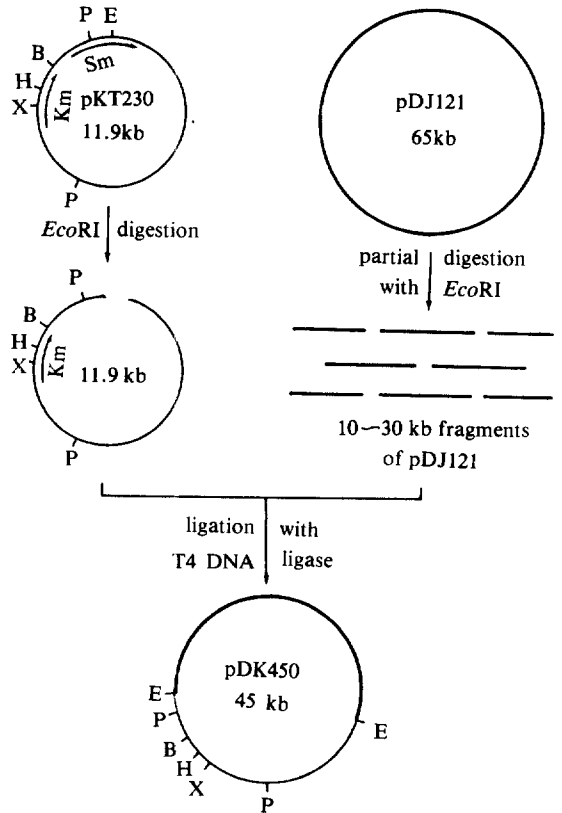


Fig. 4. Scheme for construction of the recombinant plasmid pDK450.

pDJ121 fragments partially digested with *EcoRI* were ligated with linearized pKT230 with the same restriction enzyme.

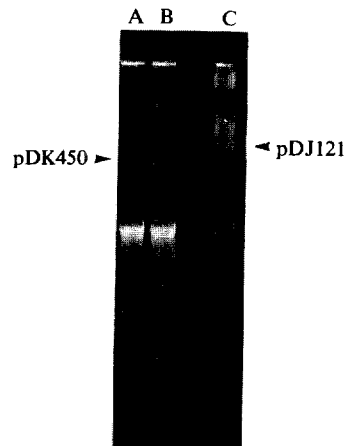


Fig. 5. Agarose gel electrophoretic analysis of the plasmids in the cloned cells and the donor cell.

Lane A and B, cloned cells with pDK450; C, DJ-12 with pDJ121.

동한 결과는 Fig.5와 같이 크기가 약 45kb로 추정되는 pDK450을 간직하고 있음을 확인하였다. 이와 같은 일련의 결과로부터 hybrid vector인 pDK450은 크기가 약 65kb인 pDJ121의 *EcoRI* 절편 중 33kb 크기의 절편이 vector plasmid인 pKT230(11.9kb)에 재조합된 것임을 알 수 있었으며, 4CBA 분해

유전자는 33kb 크기의 절편에 포함되어 있다는 것을 확인하였다. 그러므로 본 연구에서는 DJ-12 균주의 4CBA 분해유전자는 pDJ121 plasmid에 존재하고 있었으며, pKT230을 vector로 이용하여 4CBA 분해유전자를 *P. putida* KT2440에 molecular cloning함으로써 그들의 발현까지 확인할 수 있었다.

적 요

자연환경으로부터 분리한 DJ-12 균주는 4CBA 및 4CB를 비롯하여 그 대사산물인 4OHBA와 PCA를 분해하여 단일 탄소원으로 이용하였다. DJ-12 균주에서 4CBA 및 4CB 분해유전자는 약 65kb 크기의 plasmid인 pDJ121에 존재하였으며, 이 pDJ121은 *EcoRI*, *HindIII*, *SaI* 그리고 *PstI*의 절단부위를 각각 9, 11, 10 그리고 19개씩 가지고 있었다. *EcoRI*으로 처리한 pDJ121 절편을 pKT230에 ligation시켜 재조합 vector인 pDK450을 만들었으며, 이를 *Pseudomonas putida* KT2440에 transformation시켜 얻은 cloned cell에서는 4CBA 분해유전자가 잘 발현되었다.

사 사

이 논문은 1988년도 문교부 학술연구조성비(유전공학연구)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. **Birnboim, H.C. and J. Doly**, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
2. **Blake, C.K. and G.D. Hegeman**, 1987. Plasmid pCBI carries for anaerobic benzoate catabolism in *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *denitrificans* PN-1. *J. Bacteriol.* **169**, 4878-4883.
3. **Carney, B.F. and J.V. Leary**, 1989. Novel alteration in plasmid DNA associated with aromatic hydrocarbon utilization by *Pseudomonas putida* R5-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1523-1530.
4. **Don, R.H. and J.M. Pemberton**, 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145**, 681-686.
5. **Doten, R.C., L.A. Gregg and L.N. Ornston**, 1987. Influence of the *catBCE* sequence on the phenotypic reversion of a *pcdE* mutation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3175-3180.
6. **Franz, B. and A.M. Chakrabarty**, 1987. Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorocatechol degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4460-4464.
7. **Furukawa, K. and F. Matsumura**, 1976. Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alcaligenes* sp. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 251-256.
8. **Furukawa, K., K. Tonomura and A. Kamibayashi**, 1978. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 223-227.
9. **Furukawa, K. and A.M. Chakrabarty**, 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 619-629.
10. **Jenes, D.J., W. Reineke, H.-J. Knackmuss and P.A. Williams**, 1982. TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: Enzyme regulation and DNA structure. *J. Bacteriol.* **150**, 180-187.
11. **Kim, C.K., J.W. Kim, Y.C. Kim and T.I. Mheen**, 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. J. Microbiol.* **24**, 67-72.
12. **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. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 122-128.
13. **Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana**, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons in agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-457.
14. **Nakazawa, T. and T. Yokota**, 1977. Isolation of a mutant TOL plasmid with increased activity and transmissibility from *Pseudomonas putida*(arvilla) mt-2. *J. Bacteriol.* **129**, 39-46.
15. **Rangneker, V.M.**, 1988. Variation in the ability of *Pseudomonas* sp. strain B13 cultures to utilize meta-chlorobenzoate is associated with tandem amplification and deamplification of DNA. *J. Bacteriol.* **170**, 1907-1912.
16. **Shields, M.S., S.W. Hooper and G.S. Sayler**, 1985. Plasmid-mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. *J. Bacteriol.* **163**, 882-889.
17. **Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist**, 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
18. **Sylvestre, M.**, 1980. Isolation method for bacterial

isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1233-1224.

Appl. Environ. Microbiol. **42**, 737-739.

19. **Vandenbergh, P.A., R.H. Olsen and J.F. Colaruotolo**, 1981. Isolation and genetic characterization of bacteria that degrade chloroaromatic compounds.

(Received December 20, 1989)

(Accepted March 2, 1990)