

Pseudomonas sp. Strain DJ77 균주에서 Extradiol Dioxygenase를 암호화하고 있는 *phnE* 유전자의 염기배열

김영창^{1,2*} · 신명수¹ · 윤길상¹ · 박영순¹ · 김옥현^{1,2}

¹충북대학교 자연과학대학 미생물학과

²서울대학교 분자미생물학 연구센터

Pseudomonas sp. DJ77로부터 extradiol dioxygenase 유전자(*phnE*)를 클로닝하고 염기배열을 결정하였다. 921 bp의 open reading frame(ORF)이 존재하였고 개시코돈 앞에서 Shine-Dalgarno sequence를 발견하였다. *phnE* 유전자에서 만들어지는 *PhnE* 단백질은 분자량이 34,449 Da인데 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의해 측정된 분자량과 일치하였다. *PhnE*는 NahH, XylE, DmpB 등과 아미노산 배열의 상동성이 약 50%였다. DJ77에는 *bphC*와 같은 3형의 extradiol dioxygenase 유전자는 발견할 수 없었다. DJ77과 JM101(pPE17)은 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl 등의 기질을 *meta*-cleavage하여 노란색 화합물을 생성할 수 있었다.

KEY WORDS □ *Pseudomonas*, nucleotide sequence, phenanthrene, extradiol dioxygenase, degradation, hydrocarbon

미생물에 의해 방향족 탄화수소가 생분해되기 위해서는 벤젠고리가 깨어져야만 한다. 이 반응을 촉매하는 효소는 그 작용양상에 따라 크게 두 부류로 구분된다. 즉 벤젠고리에 인접하여 붙어있는 두 개의 수산기 안쪽에 위치한 C-C 결합을 끊어주는 intradiol dioxygenase(*ortho*-cleavage 효소)와 바깥쪽에 위치한 C-C 결합을 끊어주는 extradiol dioxygenase(*meta*-cleavage 효소)가 있다. 현재까지 보고된 extradiol dioxygenase에는 *Pseudomonas putida* mt-2의 TOL plasmid인 pWW0에서 밝혀진 catechol 2,3-dioxygenase인 XylE(17), naphthalene 분해 plasmid인 NAH7에서 밝혀진 catechol 2,3-dioxygenase인 NahH(6), *Pseudomonas* CF600 균주에서 phenol 분해과정에 관여하는 catechol 2,3-dioxygenase인 DmpB(1), NAH7 plasmid에서 발견된 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase인 NahC(7), biphenyl 분해균주인 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(4)과 KF715(8), *Pseudomonas paucimobilis* Q1(22), *Pseudomonas* sp. KKS102(13) 등에서 모두 발견된 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase인 BphC(각각 BphC-F, BphC-H, BphC-T, BphC-K로 부르기로 한다.), 그리고 *Pseudomonas putida* F1에서 밝혀진 3-methylcatechol dioxygenase인 TodE(24) 등이 있는데 이들은 서로 아미노산 배열의 공통점이 있어 진화적으로 공통된 기원에서 유래된 것으로 추측하고 있다(7). 다만 *Escherichia coli* C에서 발견된 3,4-dihydroxyphenylacetate (homoprotocatechuate) 2,3-dioxygenase인

HpcB는 이들과 전혀 상동성이 없다(19). 이상의 extradiol dioxygenase들은 모두 한 종류의 polypeptide로 구성되어 있지만 *Pseudomonas paucimobilis* SYK 6에서 lignin 분해에 관련된 protocatechuate 4,5-dioxygenase는 LigA와 LigB 두 종류의 subunits로 구성되어 있으며 다른 extradiol dioxygenase와는 전혀 상동성이 없다(18).

이상의 많은 종류의 보고에도 불구하고 phenanthrene 분해균의 extradiol dioxygenase에 관한 보고는 없다. 따라서 본 연구에서는 phenanthrene 분해균인 *Pseudomonas* sp. DJ77로부터 extradiol dioxygenase 유전자를 클로닝하여 염기배열을 결정하고 이 효소와 이미 보고된 다른 extradiol dioxygenase들의 아미노산 배열을 상호 비교분석 하였다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에 사용한 phenanthrene 분해균주는 공장 폐수에서 분리한 *Pseudomonas* sp. DJ77(10)을 사용하였다. 형질전환을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM101, JM109를 사용하였고 클로닝 vector로는 pBLUESCRIPT SK(+) phagemid(Stratagene Co., La Jolla, CA, U.S.A.)를 사용하였다. 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. 완전배지로는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하였으며, phenanthrene 분해능을 검사하기 위한 배지로는 MM2 최소배지(14)를 사용

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Pseudomonas</i> sp.		
DJ77	Phn ⁺ Bph ⁺	10
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE thi Δ(lac-proAB)</i> F' [<i>traD36proAB⁺lacI^qlacZΔM15</i>]	16
Plasmids		
pBLUESCRIPT		
SK(+)	Ap ^R	Stratagene Co.
pPE17	<i>phnE</i>	12
pEE11		12
pPP10		12
pKTF20	<i>bphABC</i>	5
pBP72	7.2-kb <i>XhoI</i> fragment of pKTF20 in SK(+)	This work
pPE17P	Deleted 0.7-kb <i>PstI</i> fragment of pPE17	This work
pES615	Deleted 0.61-kb <i>EcoRI-SacII</i> fragment of pEE11	This work
pSS350	0.35-kb <i>SacII</i> fragment of pEE11 in SK(+)	This work
pRR770	0.77-kb <i>RsaI</i> fragment of pPP10 in SK(+)	This work

하였고, phenanthrene은 1%의 농도로 ethyl ether에 녹인 용액을 MM2 한천배지 위에 살포하여 만든 얇은 막 상태로 공급하였다.

DNA 조작

DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy 등(21)의 방법과, Maniatis 등(15)의 방법에 따라 추출하였다. 제한효소 및 T4 DNA ligase 등은 New England Biolabs(Beverly, MA, U.S.A.), Boehringer Mannheim GmbH(Mannheim 31, Germany), Promega 사(Madison, WI, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였으며 반응 조건은 제조사의 처방에 따랐다. 여러가지 재조합 DNA의 제조 및 형질전환은 기본적으로 Maniatis 등(15)의 방법을 따랐다.

염기배열 결정

Sanger 등(20)의 dideoxy-mediated chain termination 방법으로 염기배열을 결정하였다. Qiagen Miniprep Kit(Qiagen Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.)를 사용하여 추출한 double-stranded DNA를 template로 사용하였다. -40 universal primer(5'-GT-TTTCCCAGTCACGAC-3'), reverse primer(5'-TT-CACACAGGAAACAG-3'). 그리고 Sequenase version 2.0 kit는 USB 회사(Cleveland, Ohio, U.S.A.)로부터 구입하였고, [α -³⁵S]dATP는 NEN 회사(Boston, MA, U.S.A.)로부터 구입하였다. 염기배열은 양쪽 strands를 2회 이상 실시하여 결정하였다.

Extradiol dioxygenase 활성 측정

1×10^8 cells/ml까지 배양한 세포를 4°C에서 원심 분리하여(10,000×g, 5분) 회수한 후 50 mM NaHPO₄·KH₂PO₄ 완충용액(pH 6.8)으로 2회 세척한 다음 얼음물 중탕내에서 30초 간격으로 15초 동안 10회 sonication함으로써 세포를 완전히 깨뜨렸다. 그리고 4°C에서 원심분리하여(10,000×g, 15분) 얻은 청정한

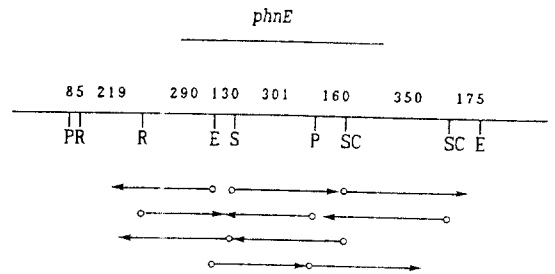


Fig. 1. Restriction map and sequencing strategy of DNA region for the *phnE* gene. Restriction sites used for sequence determination are indicated by vertical lines. Horizontal arrows indicate the extent and the direction of sequencing from each site. The location of the *phnE* gene is shown. The numbers refer base pairs. Restriction sites are: P, *PstI*; R, *RsaI*; E, *EcoRI*; S, *Sall*; SC, *SacII*.

상층액을 반응에 사용하였다. Catechol 2,3-dioxygenase(C23O), 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase의 활성은 Hegeman(9)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉 C23O 활성은 catechol이 분해되어 2-hydroxymuconic semialdehyde가 측정되는 것을 spectrophotometer로 375 nm에서 측정하였다. 3-methylcatechol과 4-methylcatechol을 기질로 사용하였을 경우에는 각각 388 nm, 382 nm에서 측정하였다. 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase의 활성은 2,3-dihydroxybiphenyl이 분해되어 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate가 측정되는 것을 434 nm에서 측정하였다. 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase의 활성은 Barnsley와 Shamsuzzaman(1)의 방

법을 약간 변형하여 285 nm에서 기질의 감소여부를 측정함으로써 알아보았다.

Southern Hybridization

Southern blotting은 BRL(Gaithersburg, U.S.A.)로부터 구입한 Photogene™ Nucleic Acid Detection System을 사용하였다.

결과 및 고찰

phnE 유전자의 염기배열

전보(12)에서 제조한 pPH12, pSS21, pEE14, pEE11, pSH15, pPP10과 pPE17 등과 Table 1에서 보는 바와같이 새로이 제조한 pPE17P, pES615, pSS350 등을 이용하여 *phnE* 유전자가 위치하고 있는 1.7 kb의 *PstI-EcoRI* 지역에 대하여 삽입된 방향에 따라 -40 primer 또는 reverse primer를 사용하여 sequencing하였다(Fig. 1). 이중에서 Fig. 2에 나타난 960 bp의 염기배열을 분석한 결과, 19번째 nucleotide와 939번째 nucleotide 사이에서 921 bp로 이루어진 open reading frame(ORF)을 발견하였다. Shine-Dalgarno sequence(GAGGAG)는 이 ORF의 개시 코돈으로부터 7 bp 앞에 존재하였다. 이 ORF의 G + C 함량은 57.4%이었다. 이 ORF가 암호화하고 있는 단백질의 분자량은 34,449 Da으로, 전보(12)에서 언급한 바와 같이 extradiol dioxygenase 활성을 나타내는 재조합 plasmid인 pHENX7이나 pPE17 등을 갖고 있는 JM101 균주를 IPTG로 유도하였을 때 다량 만들어지는 PhnE polypeptide의 분자량(34

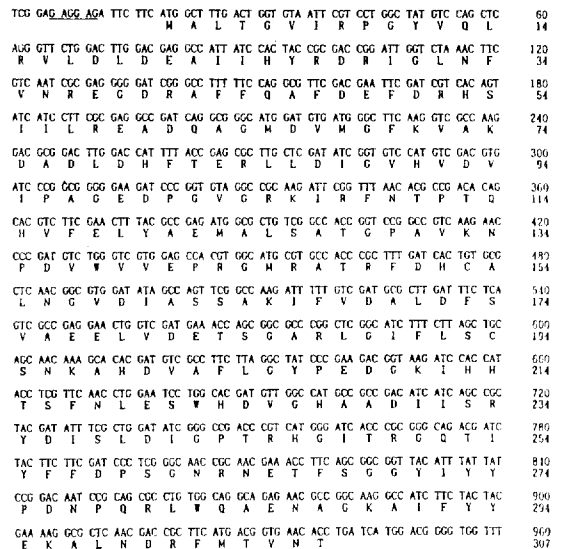


Fig. 2. Nucleotide sequence of the *phnE* gene. A putative ribosome binding site is underlined, and the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is also presented.

kDa)과 일치하였다. 이 ORF는 307개의 아미노산으로 이루어져 있는데 NahH, XylE, DmpB 등의 아미노산 숫자와 정확하게 일치하였다.

염기배열로부터 유추한 PhnE 효소의 아미노산 배열을 지금까지 알려진 열한가지 extradiol dioxygen-

Table 2. Summary of maximum homology between the amino acid sequences of meta-cleavage enzymes* (%)

	TYPE I			TYPE II		TYPE III				
	NahH	XylE	DmpB	NahC	BphC-T	BphC-K	BphC-F	BphC-H	TodE	
NahH										
XylE	84									
DmpB	87	83								
NahC	28	29	30							
BphC-T	29	32	29	60						
BphC-K	29	30	28	40	40					
BphC-F	29	31	28	38	40	64				
BphC-H	31	32	28	38	41	66	91			
TodE	29	30	29	39	37	51	54	56		
PhnE	50	50	53	30	31	30	30	31	30	

*NahH : Catechol 2,3-dioxygenase encoded by the NAH7 plasmid.
 XylE : Catechol 2,3-dioxygenase encoded by the TOL plasmid.
 DmpB : Catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* CF600.
 NahC : 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase encoded by the NAH7 plasmid.
 BphC-T : 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *P. paucimobilis* Q1.
 BphC-K : 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain KKS102.
 BphC-F : 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *P. pseudoalcaligenes* KF707.
 BphC-H : 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *P. putida* KF715.
 TodE : 3-methylcatechol dioxygenase from *P. putida* F1.

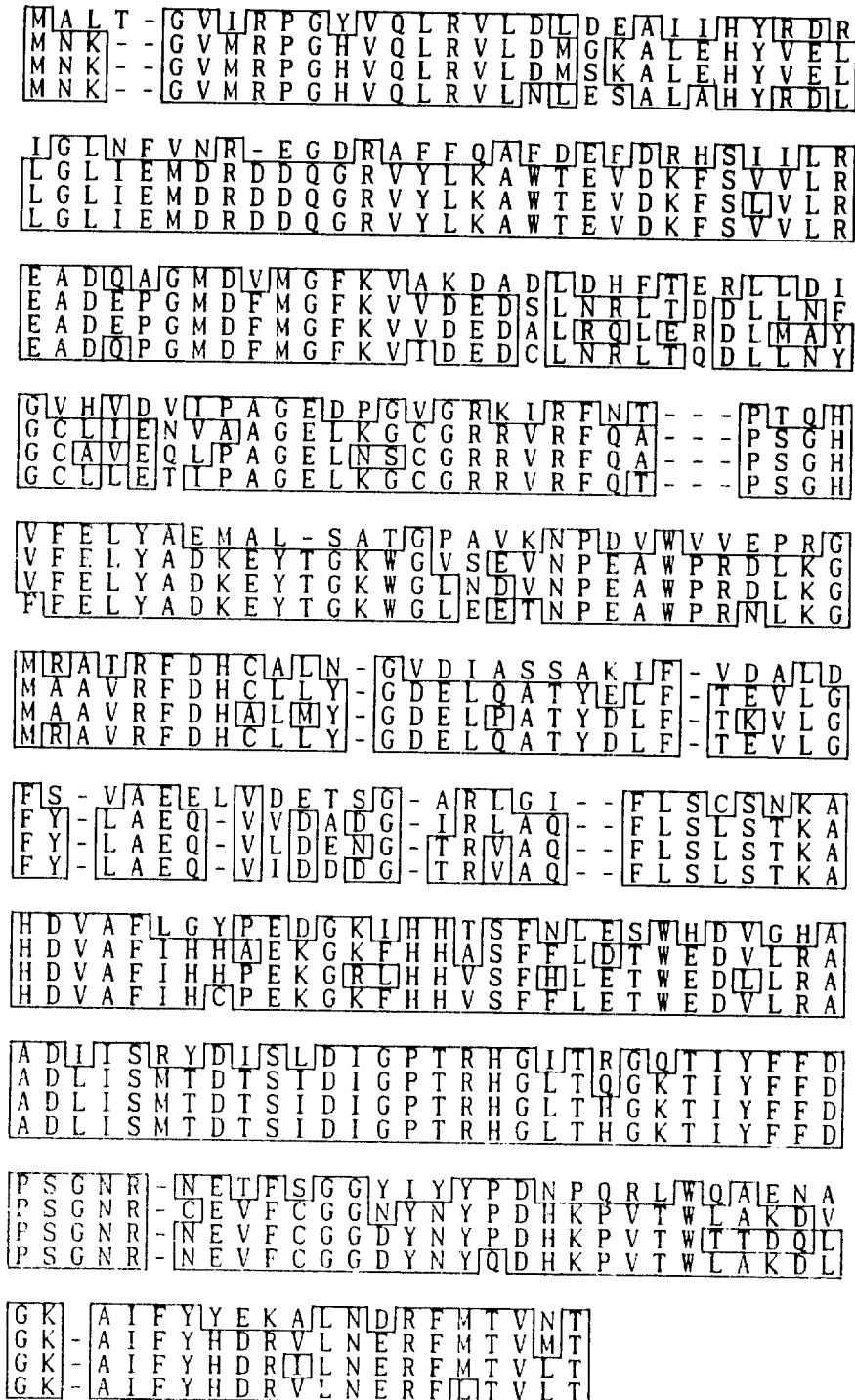


Fig. 3. Homologous region of the *phnE* gene product and type I meta-cleavage enzymes. *NahH*, catechol 2,3-dioxygenase encoded by the NAH7 plasmid (6); *XylE*, catechol 2,3-dioxygenase encoded by the TOL plasmid (17); *DmpB*, catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* CF600 (2).

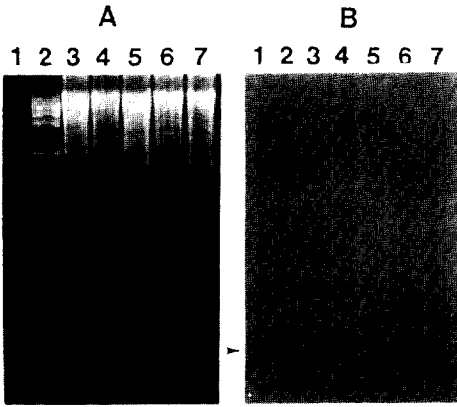


Fig. 4. Southern hybridization of DNA molecules shown in panel A to a *bphC* probe (panel B). Lane 1 contains the positive control DNA of pBP72 digested with *XhoI* and *Clal*. 2, plasmid pHEN1 DNA from DJ77 digested with *XhoI*; 3, total DNA from DJ77 digested with *BglIII*; 4, total DNA from DJ77 digested with *BamHI*; 5, total DNA from DJ77 digested with *HindIII*; 6, total DNA from DJ77 digested with *PstI*; 7, total DNA from DJ77 digested with *XhoI*.

ase의 아미노산 배열과 비교하였다. 지금까지 밝혀진 extradiol dioxygenase들은 두 종류의 subunit로 이루어진 것과 한 종류의 polypeptide로만 이루어진 것으로 대별되는데 이 중 후자에 속하는 extradiol dioxygenase들은 아미노산 배열의 상동성에 의거하여 크게 세 부류로 나눌 수 있다. 제 1형에는 NahH, XylE와 DmpB, 제 2형에는 NahC와 Bph-T, 제 3형에는 BphC-F, BphC-H, BphC-K와 TodE가 속한다 (Table 2). 각 형에 속하는 효소간에는 50% 이상의 상동성을 보이나 서로 형이 다른 효소사이에는 약 40% 이하의 상동성을 보인다. PhnE 효소는 아미노산 배열이 제 1형과 유사하지만 1형에 속하는 NahH, XylE, DmpB는 서로 83-87%의 높은 상동성을 나타내는데 비하여 PhnE와는 상동성이 약 50-53%로 비교적 낮은 편이었다 (Fig. 3). 그러나 NahC, BphC-T, BphC-K, BphC-F, BphC-H, TodE, HpcB와 LigB 등과는 31% 이하로 거의 상동성이 없었다.

DJ77에는 제 3형의 extradiol dioxygenase 유전자가 존재하지 않는다.

Pseudomonas sp. DJ77 균주는 phenanthrene을 3,4-dihydroxyphenanthrene, 1-hydroxy-2-naphthoic acid를 거쳐서 salicylic acid, catechol로 분해하는 것으로 추측되며 또한 biphenyl도 분해할 수 있다(11). 따라서 DJ77에는 benzene 고리를 meta-cleavage하여 노란색 화합물을 형성할 수 있는 효소로서 3,4-dihydroxyphenanthrene dioxygenase, 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase

등 세가지 형태의 extradiol dioxygenase가 모두 존재할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 NAH7 plasmid와 pWWO-1 plasmid(3)에서 *nahC*와 *nahH* 유전자가 서로 다른 operon 상에 각각 따로 존재하는 것처럼(23) DJ77에서도 몇가지 예상되는 extradiol dioxygenase 유전자가 서로 독립적으로 존재할 것으로 생각되었다. 그래서 *phnE* 이외의 다른 extradiol dioxygenase 유전자를 클로닝하려 하였지만 반복적인 실험에도 불구하고 클로닝할 수 없었다(12).

Furukawa로부터 분양받은 pKTF20(5)을 *XhoI*으로 절단하여 얻은 7.2 kb의 *bphABC* 절편을 pBluescript SK(+)의 *XhoI*에 삽입하여 pBP72를 제조하였다 (Table 1). BP72를 *XhoI*과 *Clal*으로 동시에 절단하면 3개의 절편이 생기는데 (Fig. 4A)의 1번 lane), 이중 제일 작은 약 1.1 kb 절편에 *bphC* 유전자가 존재한다. 이 *bphC* 절편을 probe로 하여 *BglIII*, *BamHI*, *HindIII*, *PstIII*, *XhoI*으로 절단한 DJ77의 total DNA, 그리고 *XhoI*으로 절단한 DJ77의 pHEN1 plasmid DNA와 hybridization을 하였다. Fig. 4B에서 보는 바와같이 control DNA를 loading한 1번 lane에서는 hybridization된 band가 나타났지만 DJ77의 total DNA나 plasmid DNA를 loading한 lane들에서는 hybridization band가 전혀 나타나지 않았다. 이와같은 실험결과는 DJ77에 제 3형에 속하는 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase가 존재하지 않으며 PhnE 효소가 이 기능을 대신하리라는 추측을 낳게 한다. PhnE 효소의 기질 특이성

DJ77이 갖고 있는 여러 extradiol dioxygenase 활성이 별도의 유전자로부터 만들어진 개개의 효소에 의해서 나타나는 것이 아니라, 하나의 유전자로부터 만들어진 단백질에 의해서 여러 기능이 한꺼번에 나타나는 것은 아닌지 알아보기 위하여 PhnE 효소의 기질특이성을 조사하였다. JM101(pPE17)은 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl을 meta-cleavage하였으나, 1,2-dihydroxynaphthalene은 분해할 수 없었다. 이러한 *in vitro* 실험결과는 PhnE 효소가 *in vivo*에서도 대사과정의 여러 단계에 관여할 가능성을 시사한다.

감사의 말

본 논문은 1990년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)와 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터) 연구비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Barnsley, B.A. and K.M. Shamsuzzaman, 1974. The regulation of naphthalene metabolism in pseudomonads. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 582-589.
2. Bartilson, M. and V. Shingler, 1989. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-

- dioxygenase-encoding gene of phenol catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene*, **85**, 233-238.
3. Cane, P.A. and P.A. Williams, 1986. A restriction map of naphthalene catabolic plasmid pWW60-1 and the location of some of its catabolic genes. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2919-2929.
 4. Furukawa, K., N. Arimura and T. Miyazaki, 1987. Nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.*, **169**, 427-429.
 5. Furukawa, K. and T. Miyazaki, 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.*, **166**, 392-398.
 6. Ghosal, D., I-S. You and I. C. Gunsalus, 1987. Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xylE* of TOL pWVO. *Gene*, **55**, 19-28.
 7. Harayama, S. and M. Rekik, 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15328-15333.
 8. 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.
 9. Hegeman, G.D., 1966. Synthesis of the enzyme of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **91**, 1140-1154.
 10. 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.
 11. Kim, Y.C., H.S. Kim, M.S. Park and C.K. Kim, 1989. Molecular cloning and high-level expression of phenanthrene catabolic genes. *Genet. Eng. Res.*, **3**, 9-16.
 12. Kim, Y.C., K.S. Youn, M.S. Shin, H.S. Kim, M.S. Park and H.J. Park, 1992. Molecular cloning of a gene cluster for phenanthrene degradation from *Pseudomonas* sp. strain DJ77 and its expression in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.*, **30**, 1~7.
 13. 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.
 14. Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 454-457.
 15. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 16. Messing, J., 1979. A multipurpose cloning system based on the singlestranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.*, **2**, 43-48.
 17. Nakai, C., H. Kagamiyama and M. Nozaki, 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2923-2928.
 18. Noda, Y., S. Nishikawa, K.-I. Shiozuka, H. Kadokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasaki, 1990. Molecular cloning of the protococatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.*, **172**, 2704-2709.
 19. Roper, D.I. and R.A. Cooper, 1990. Subcloning and nucleotide sequence of the 3,4-dihydroxyphenylacetate (homoprotocatechuate) 2,3-dioxygenase gene from *Escherichia coli* C. *FEBS Lett.*, **275**, 53-57.
 20. Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5463-5467.
 21. Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist, 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 22. Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki and K. Furukawa, 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry*, **27**, 3990-3996.
 23. Yen, K.M. and I.C. Gunsalus, 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH 7. *J. Bacteriol.*, **162**, 1008-1013.
 24. Zylstra, G.J. and D.T. Gibson, 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J. Bacteriol.*, **164**, 14940-14946.

(Received September 18, 1991)

(Accepted October 7, 1991)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence of *phnE* Gene Encoding Extradiol Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain DJ77

Kim, Young-Chang^{1,2*}, Myeong-Su Shin¹, Kil-Sang Youn¹, Young-Soon Park¹, and Ug-Hyeon Kim^{1,2} (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, KOREA, and ²Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

We cloned the *phnE* gene encoding extradiol dioxygenase from *Pseudomonas* sp. DJ77 and determined the nucleotide sequence. One open reading frame of 921 bp was found. Preceding the initiation codon ATG was a Shine-Dalgarno sequence. The molecular mass calculated from the predicted amino acid sequence was 34,449 Da which agrees well with that of 34 kDa measured by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. PhnE shows amino acid sequence homology of about 50% with NahH, XylE, and DmpB. There was no type III extradiol dioxygenase gene like *bphC* in DJ77. DJ77 and JM101 harboring pPE17 were able to convert catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 2,3-dihydroxybiphenyl to yellow metabolic compound by *meta*-cleavage of aromatic ring.