The Korean Journal of Microbiology, Vol. 38, No. 4, December 2002, p. 260-266
Copyright©2002, The Microbiological Society of Korea

Ralstonia eutropha JMP134에서 페놀분해에 관여하는 조절유전자의 Subcloning 및 염기서열 분석

김기황 · Subramanian Chitra† · 김영준*
가톨릭대학교 생명과학부 환경생물학

Ralstonia eutropha* JMP134로부터 페놀대사의 조절에 관여하는 유전자부위를 cloning하여 염기서열을 파악하였으며 그 특성을 조사하였다. 염기서열 분석 결과 두 개의 open reading frame (ORF1 & ORF2)들을 발견하였다. ORF1은 페놀분해 구조유전자중의 마지막 인자인 *phlX*의 stop codon으로부터 454 bp 아래에서 시작하여 총 501개의 아미노산으로 구성되었으며 ORF2는 ORF1의 *stop codon*으로부터 1 bp 위쪽에서 4개의 염기쌍과 중첩된 상태에서 시작하여 총 232개의 아미노산으로 구성되어 있는 것으로 나타났다. 단백질 배열을 분석해본 결과 ORF1은 transcriptional activator로 작용하는 NtrC family에 속하는 것으로 확인되었으며, ORF2는 negative regulator로 알려진 GntR family에 속하는 것으로 나타났다. ORF1과 ORF2를 encoding하는 유전자를 각각 *phlR2*와 *phlA*로 명명하였으며 이들의 가능한 조절기작을 고찰하였다.

Key Words □ **GntR family, negative regulator, phenol, *Ralstonia eutropha* JMP134, transcriptional activator**

페놀은 정유소를 비롯하여 석유화학공장 및 다양한 산업 공정의 과정 속에서 외부로 유출되고 있으며, 그 독성이 강하여 미 환경청에 의해 위험물질 우선순위로 분류되어 있다(14). 근래에 국내에서도 페놀류에 의한 토양, 수질 등의 오염 사태가 빈발함에 따라 인간의 생명과 자연 생태계가 위협받고 있는 실정으로 이에 대한 대책이 시급하다고 할 수 있다. 다행히 페놀류의 독성 물질들이 다수의 미생물들에 의해 생분해되고 있음이 밝혀져 이에 대한 관심이 고조되고 있다(1,2,7,12, 19,24,28-30). 페놀은 phenol hydroxylase에 의해 catechol로 분해 된 후 계속적으로 다른 효소에 의해 점차 무독화 되는 과정을 거친다(Fig. 1)(12).

R. eutropha JMP134 세균은 페놀을 비롯하여 벤젠, 톨루엔 등의 여러 방향족 화합물을 분해하고 있으며 특히 독성이 강한 염소 치환 방향족 화합물들을 분해하고 있는 것으로 알려져 있다(24,25). 본 세균은 또한 난분해성 제초제인 2,4-dichloro phenoxyacetate (TFD)를 분해하는 유전자가 plasmid (pJP4)상에 존재하는 것으로 나타나 유전학적, 진화학적 관심의 대상으로 이에 대한 많은 연구가 수행되어져왔다(4,15,16,23). Harker와 Kim (8)은 본 세균이 강한 독성과 함께 발암물질로 알려진 삼염화에틸렌(TCE)이 plasmid와 염색체 상에서 각각 서로 다른 분해 경로를 통하여 공대사(cometabolism)되고 있는 것을 발견하고 plasmid상에서는 TFD의 분해경로를, chromosome상에서는 페놀

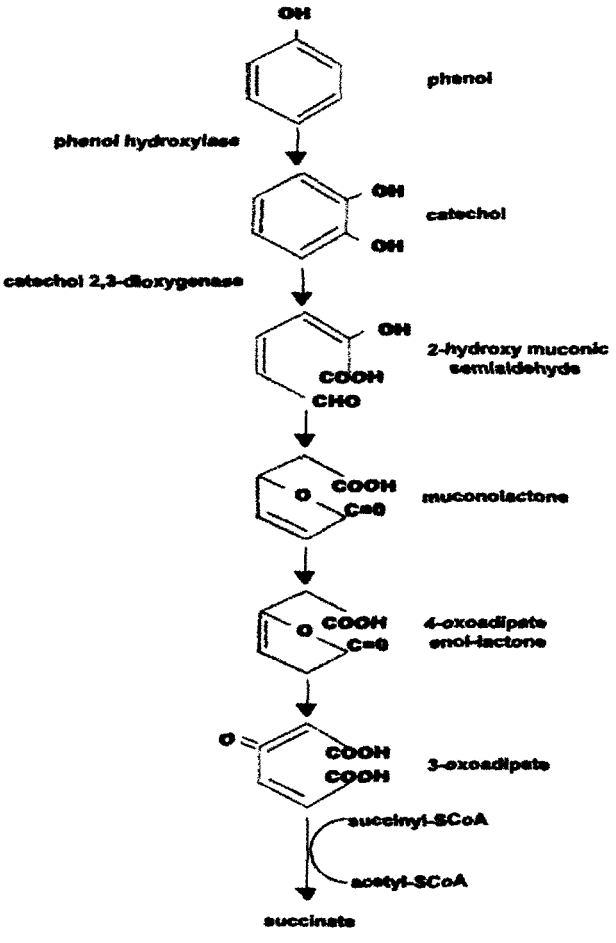

Fig. 1. Metabolic pathway of phenol degradation (*meta*-pathway).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 032-340-3371, Fax: 032-340-3765
E-mail:yjunkim@www.cuk.ac.kr
†Present address: Dept. of Microbiol. & Immunol., Univ. of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

의 분해경로를 통한다는 것을 밝혀냈다. 한편, *R. eutropha* JMP134 내에 존재하는 plasmid pJP4의 경우엔 많은 분자 유전학적인 연구가 수행되었음에도 불구하고 염색체상의 페놀분해에 대한 조절기작에 대한 연구가 매우 미흡한 상태인데 이는 부분적으로 본 세균에 있어서 페놀분해의 조절기작이 매우 복잡하게 얽혀있음에 그 이유가 있다 할 수 있다(18). 과거 Kim 등(17)은 본 세균의 돌연변이주를 이용하여 페놀분해 유전자를 분리해내는데 성공하였으며, 또한 TCE를 분해하는 유전자를 cloning함으로써 본 세균에서 페놀의 유도 없이도 TCE를 분해하는 세균을 개발, 그 분해능에 대한 결과를 발표한바 있다. Kim과 Harker (18)는 또한 본 세균을 대상으로 페놀대사의 효소발현에 관여하는 것으로 나타난 DNA부위를 cloning하여 이 부분이 페놀분해 효소의 활성을 증진시킴과 동시에 억제작용의 기능도 나타내는 것으로 밝힌바 있다.

본 연구에서는 *R. eutropha* JMP134 세균으로부터 조절기능을 담당하는 부위를 subcloning하여 이들의 염기서열 분석의 결과 본 조절부위는 positive regulator로 작용하는 NtrC 계열의 조절인자(PhlR2)와 negative regulator의 역할을 하는 GntR 계열의 조절인자(PhlA)를 coding하는 두개의 조절유전자로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

재료 및 방법

배지조성, 실험균주 및 plasmid

이번 실험에서 사용된 모든 *Escherichia coli, R. eutropha, Pseudomonas* strain들과 plasmid들은 Table 1에 정리하였다. 실험에 이용된 균주들은 LB 배지에 접종하여 *E. coli*는 37°C에서, *R. eutropha*와 *Pseudomonas* strain은 30°C에서 진탕 배양하였다. 최소배지는 M9 배지였고, 조성은 다음과 같다(per liter): Na_2HPO_4, 6 *g*; K_2HPO_4, 3 *g*; NaCl, 0.5 *g*; NH_4Cl, 1 *g*; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

Table. 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and Plasmids	Relevant Characteristics	References
Ralstonia eutropha		
JMP134	Prototroph, Phl^+ Tfd^+ Hg^r	24
AEO106	Prototroph, Phl^+ Tfd^-	9
Pseudomonas aeruginosa		
PAO1c	Prototroph	11
Plasmids		
pMMB67EH	*Tac* expression cloning vector with cloning sites of pUC18, Ap^r	6
pVK102	IncP, cos^+, Km^r, Tc^r	U.S.B co.
pRO1727	Cloning vector, Tc^r, Cb^r	3
pRK415	The broad host ranged expression cloning vector, Tc^r	22
pTZ18R	Blue screening cloning vector, Ap^r	18
pYK301	16.8 kb *Hind*III digest of AEO106 DNA cloned into pVK102, *phlR2*$^+$, *phlH* $^+$, *c23O*$^+$, Tc^r	17
pYK3011	11.2 kb *Hind-BamH*I fragment from pYK301 cloned into pMMB67EH, *phlR2*$^-$, *phlH*$^+$, *c23O*$^+$, Ap^r	17
pYK3027	7.5 kb *Pst*I-*Hin*dIII fragment from pYK3012 cloned into pTZ18R, *phlR2*$^+$, Ap^r	18
pYK3029	5.0 kb *Pst*I-*EcoR*I fragment from pYK3027 cloned into pRO1727, *phlR2*$^+$, Tc^r	18
pKSU101	3.1 kb *BamH*I-*EcoR*I fragment from pYK3029 cloned into pUC19, Ap^r	this study
pKSU102	0.6 kb *BamH*I-*Sal*I fragment from pKSU101 cloned into pUC19, Ap^r	this study
pKSU103	0.5 kb *EcoR*I-*Sal*I fragment from pKSU101 cloned into pUC19, Ap^r	this study
pKSU104	0.5 kb *Pst*I-*Xho*I fragment from pKSU101 cloned into pUC19, Ap^r	this study
pKSU105	0.65 kb *Xho*I-*Pst*I fragment from pKSU101 cloned into pUC19, Ap^r	this study
pKSU106	0.95 kb *Pst*I-*EcoR*I fragment from pKSU101 cloned into pUC19, Ap^r	this study
pYK401	2.9 kb *BamH*I-*EcoR*I fragment from pKSU3029 cloned into pRK415, Ap^r	this study
pYK402	1.6 kb *EcoR*I-*Pst*I fragment from pKSU3029 cloned into pRK415, Ap^r	this study
pYK403	2.5 kb *EcoR*I-*EcoR*I fragment from pKSU3029 cloned into pRK415, Ap^r	this study
pYK404	2.0 kb *BamH*I-*Pst*I fragment from pKSU3029 cloned into pRK415, Ap^r	this study

Phl^-; deficient in phenol degradation, Tfd^-; deficient in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation, Hg^r; mercury resistant.
Gene designations: *phlH*; phenol hydroxylase, *c23O*; catechol 2,3-dioxygenase, *pHLR2*; regulatory gene for phenol hydroxylase.
Antibiotics: Ap, Km, and Tc refer to ampicillin, kanamycin, and tetracycline respectively.

0.246 *g*; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 *mg*; phenol의 최종 농도가 0.05%가 되도록 첨가하였다. 또 LB 배지의 조성은 다음과 같다(per liter): Tryptone, 10 *g*; yeast extract, 5 *g*; NaCl, 5 *g*; 2% Agar. 배양시 사용된 항생제와 그 농도는 다음과 같다. *Pseudomonas* strain: tetracycline (50 *μg/ml*), rifampin (150 *μg/ml*) for *E. coli*: tetracycline (25 *μg/ml*), ampicillin (100 *μg/ml*), kanamycin (50 *μg/ml*). 또한 β-galactosidase의 생성여부를 살펴보기위해 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, 50 *μg/ml*)와 IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactoside, 100 mM)를 사용하였다. 한편 competent cell을 만들기 위한 세균의 접종배양액은 YENB 배지를 사용하였다. 그 조성은 다음과 같다(per liter) : Bacto yeast extract, 7.5 *g*; Bacto nutrient broth, 8.0 *g*. 그리고 electroporation시 사용되는 SOC 배양액의 조성은 다음과 같다 (per liter) : Bacto tryptone, 20 *g*; Bacto yeast extract, 5 *g*; NaCl, 0.5 *g*; 0.25 M KCl, 10 *ml*; 1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 *ml*; 1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 *ml*; 1 M glucose, 20 *ml*.

DNA분리 및 cloning

Plasmid의 크기를 확인하고 cloning을 하기 위한 insert DNA와 vector plasmid의 분리에는 100°C의 물에 넣어 45 초 동안 열충격(heat shock)을 주는 boiling method를 사용하였다(26). 염기서열 분석을 하기 위한 순도 높은 plasmid를 추출하기 위한 방법으로 20 *ml* 크기의 Qiagen tip (Qiagen, Chatsworth, USA)을 이용하여 회사에서 제공하는 사용 안내문에 따라 실험을 수행하였다. 각각의 제한효소들과 ligase는 Promega 사에서 제공하는 효소들과 buffer들을 사용했으며, plasmid들을 분리하기 위해 DNA *Prep-Mate*™II kit (Bioneer, Changwon, Korea)를 이용하여 회사에서 제공하는 방법으로 gel purification을 실행하였다. Ligation 한 후에 크기를 확인하고 competent cell인 DH5α에 형질전환시킨 다음, LB/X-gal/IPTG/Ap^{50} 배지에 도말하여 흰색의 집락(white colony)을 선별한 다음 다시 plasmid를 추출, 그 크기를 통해 cloning을 확인하였다.

염기서열 분석

염기서열 분석을 위해 Qiagen tip (20 *ml*) kit로 plasmid를 분리한 후에 서울대학교 기초과학공동기기원 DNA Sequencer (ABI PRISM 377 DNA sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

효소활성 측정

Phenol hydroxylase의 활성 측정은 Sala-Trepat 등(27)이 설명한 Clark oxygen electrode를 사용하여 측정하였다. *P. aeruginosa* PAO1c를 탄소원을 달리한 각각의 M9 최소배지에서 진탕배양기(shaking incubator)로 37°C에서 배양한 후 지수성장기의 세균을 모아 M9으로 2 번 세척한 다음 세균을 모았다. 이후 세균을 425 nm의 파장에서 O.D.값이 1.0이 되도록 M9 배지에 현탁한 후, 탄소원이 남아있지 않도록 2 시간 동안 진탕배양 시켰다. 세균 부유액을 electrode chamber (Gilson Medical Electronics, Middleton, USA)에 넣은 다음 페놀을 주입하여 용존산소의 변화정도를 Clark oxygen electrode (YSI 5300; Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, Ohio, USA)를 이용하여 측정하였다.

염기서열 비교, 분석 및 아미노산배열 분석을 위한 program

유전자의 염기서열 비교를 위해서 인터넷에서 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 이용하여 기존에 밝혀진 DNA 염기서열들과 비교 분석하여 염기의 유사성을 비교하였다. DNA sequencer에 의해 분석된 자료들은 DNASIS 프로그램을 통하여 염기서열을 비교, 분석하고 제한효소위치를 알아냈으며, Genedoc과 Clustalw 프로그램을 이용하여 단백질 배열을 분석하였다.

결 과

페놀분해 유전자 조절부위의 위치확인 및 subcloning

16.8 kb 크기의 cosmid pYK301은 페놀분해의 첫 번째 분해를 담당하는 phenol hydroxylase를 생성하는 유전자군을 가지고 있다(17). Kim과 Harker (18)는 pYK301로부터 pYK3029내에 페놀분해의 조절기능에 관여하는 DNA부위가 존재하고 있음을 암시하였다. 본 연구에서는 pYK3029내의 페놀분해 조절기능을 지닌 가능한 open reading frame (ORF)의 존재여부를 확인하기 위하여 subcloning을 수행하였다. 우선 phenol hydroxylase의 활성을 억제하는 부위를 좀더 좁히기 위하여 pYK3029를 다양한 크기로 절단한 뒤 광범위 기주 plasmid vector인 pRK415에 subcloning 하였다(Fig. 2). Subcloning된 각각의 plasmid들을 phenol hydroxylase의 유전자가 들어있는 pYK3011과 함께 *P. aeru-ginosa* PAO1c에 동시에 형질전환시켜 효소의 활성을 측정하였다.

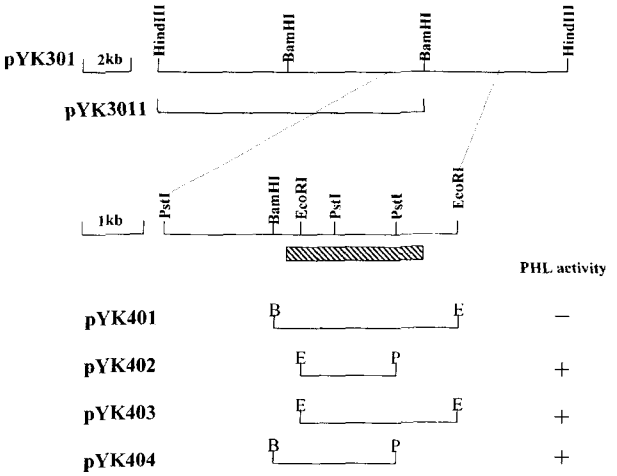

Fig. 2. Phenol hydroxylase activity of *P. aeruginosa* PAO1c with various plasmids. PHL activity; Phenol hydroxylase activity when *in trans* with pYK3011 in *P. aeruginosa* PAO1c. ▨ ; Putative negative regulatory genes.

pRK415에 subcloning하여 형질전환시킨 4 개의 plasmids중에서 pYK401를 제외하고 나머지 3 개의 plasmids, 즉 pYK402, pYK403, pYK404의 경우에는 phenol hydroxylase의 활성에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이에 따라 *P. aeruginosa* PAO1c에서 페놀분해 효소의 활성을 억제하는 조절기능을 지닌 부위는 최소 1.7 kb의 *EcoRI-PstI* 부위를 포함하여 약 3.0 kb의 *BamHI-EcoRI* 부위내에 존재하는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 3.0 kb의 *BamHI-EcoRI* 부위를 약 0.5~0.7 kb 내로 절단한 뒤 이를 subcloning하여 양방향으로 염기서열을 파악하였다.

페놀분해유전자 조절부위의 염기서열파악 및 단백질 배열 비교분석

pYK402내의 3.0 kb *BamHI-EcoRI* 부분을 약 0.5-0.7 kb내로 절단한 뒤 이를 pUC19에 subcloning한 후 얻어진 plasmids를 universal primers를 이용하여 양쪽 방향으로 sequencing을 수행하여 염기서열을 파악하였다(Fig. 3). 염기서열의 분석결과 본 DNA 절편내에 조절인자로 추정되는 2 개의 ORFs (ORF1 and ORF2)가 존재하고 있음을 발견하였다. ORF1의 경우 8 개의 유전자로 구성된 phenol hydroxylase 유전자들의 가장 끝부분에 위치한 *phlX*의 stop codon으로부터 454 bp 떨어진 곳에서 시작하여 1506 bp에 이르렀으며 이에 해당하는 501 개의 아미노산 배열로 구성되어 있는 것으로 나타났다. ORF2는 ORF1의 stop codon으로부터 1 bp 위쪽에서 시작하여 ORF1의 stop codon과 중첩되어 있었으며 699 bp의 염기와 232 개의 아미노산으로 구성되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 4). 한편 이들 두 ORFs에 대한 다른 단백질과의 아미노산 배열의 유사성을 조사한 결과에 따르면 ORF1의 경우 transcriptional activator인 NtrC 계열의 그룹들과 높은 동질성을 나타내었다. ORF1은 phenol hydroxylase의 구조유전자 내부에 존재하는 동일계열의 PhlR을 비롯하여 XylR (13), DmpR (29), PoxR (10) 등의 방향족화합물의 분해에

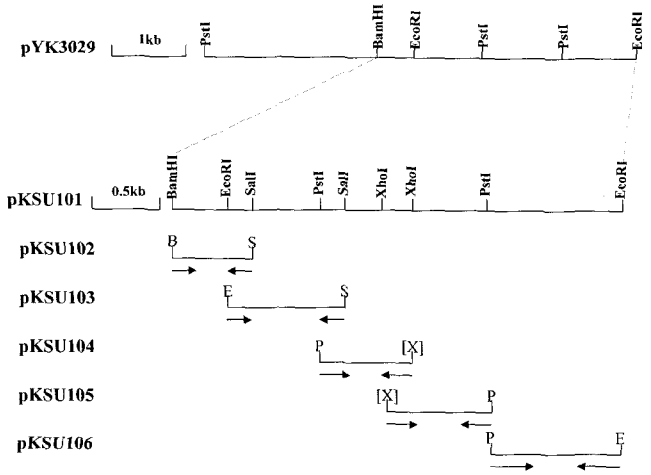

Fig. 3. Subcloning strategy of pYK3029. Arrows indicate the direction of DNA sequencing. [ ] ; Site was delete by S1 nuclease.

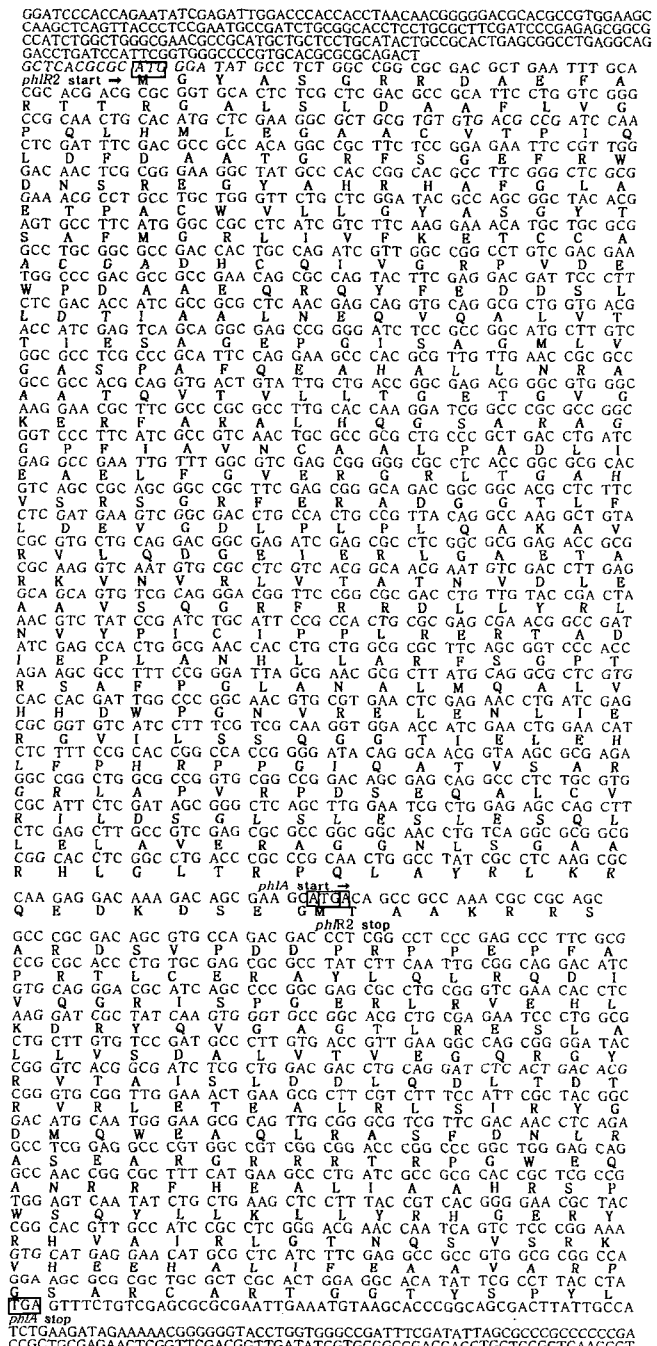

Fig. 4. Map of the 3.1 kb insert in pKSU101 showing the relative positions of the *phlR2* and *phlA* genes. Thick letters indicate the amino acid alignment of *phlR2* and *phlA*. Boxes indicate start and stop codons of *phlR2* and *phlA*.

관련된 NtrC 계열의 transcriptional activator들과 높은 유사성을 보여주었다(Fig. 5). 이에 따라 ORF1에 관련된 유전자를 PhlR의 뒤를 이어 phlR2라 명명하였다. ORF2에 대한 추정 아미노산의 분석결과 BphR (5) 등 negative 조절인자로 알려진 GntR family

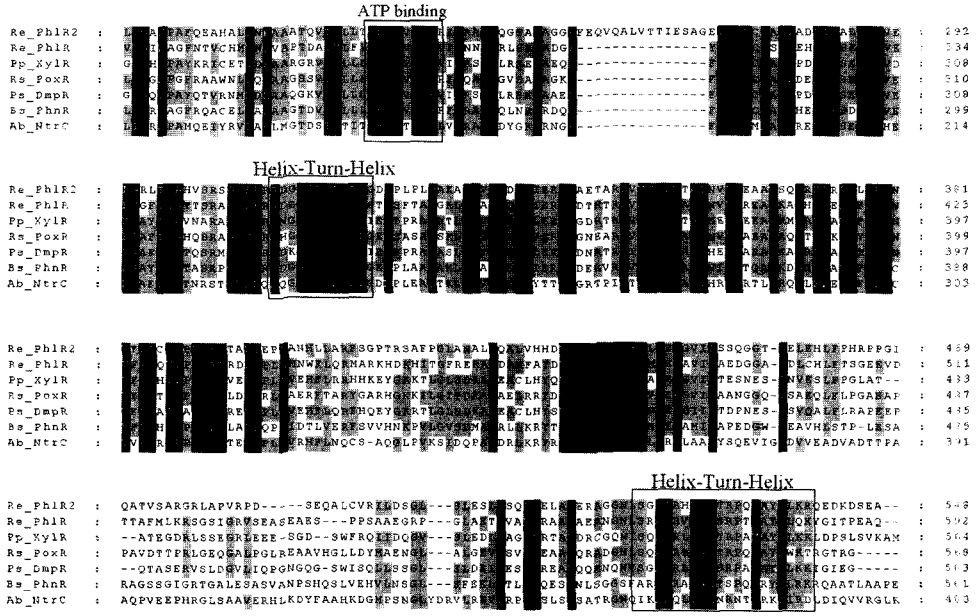

Fig. 5. Amino acid alignment of putative PhlR2 with other proteins. Identical amino acids are shown in white point on a black background. The origins of the sequences were as follows; Re, *R. eutropha*; Pp, *Pseudomonas putida*; Rs, *Ralstonia* sp.; Ps, *Pseudomonas* sp.; Ab, *Azospirillum brasilense*. Helix turn helix motifs and ATP binding motif are indicated in boxes.

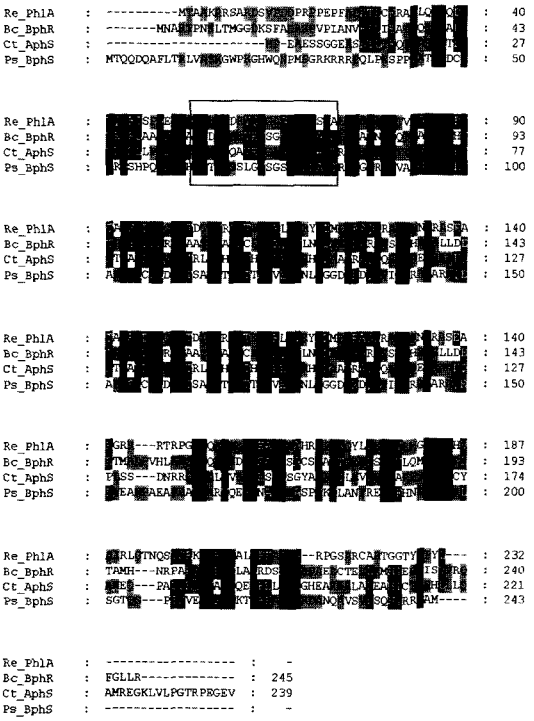

Fig. 6. Amino acid alignment of putative PhlA with other proteins. Identical amino acids are shown in white point on a black background. The origins of the sequences were as follows; Re, *R. eutropha*; Bc, *Burkholderia cepacia*; Ct, *Comamonas testosteroni*; Ps, *Pseudomonas* sp. Helix-turn-helix DNA binding motif at N-terminal region, which is a typical characteristics of the members of GntR family, is indicated in box.

에 속하는 단백질들과 유사한 아미노산 배열을 보여주었다(Fig. 6). ORF2에 대한 추정 유전자를 *phlA*로 명명하였다.

고 찰

본 연구에서는 *R. eutropha* JMP134로부터 페놀대사의 첫 번째 효소인 phenol hydroxylase의 발현에 관련된 것으로 밝혀진 조절부위에 대하여 염기서열을 파악하여 2 개의 ORF들이 존재함을 알 수 있었다. 이들을 생성하는 유전자들은 하나의 stop codon에 다른 유전자의 start codon이 겹쳐있는 것으로 나타나 이들 유전자가 하나의 mRNA로 통합되어 전사되고 있음을 시사하고 있다. 한편 이들에 대한 아미노산 배열의 유사성 분석결과 ORF1의 경우 transcriptional activator인 NtrC 계열의 조절단백질군에 속하는 것으로 나타났으며, ORF2의 경우 negative regulator인 GntR 계열의 아미노산 구조와 유사한 것으로 나타남에 따라 과거 Kim과 Harker (18)가 발표한 것처럼 pYK3029에 대한 억제인자(repressor)와 활성인자(activator)로서의 동시역할이 이들 유전자의 각각의 발현에 의한 독립적 역할일 가능성을 강력히 시사하고 있다. 한편 억제인자(repressor)의 역할을 담당할 것으로 추정되는 ORF2를 포함하는 유전자 부위(pYK403)가 효소의 활성을 억제하지 못하는 것은 이를 담당하는 유전자, *phlA*가 ORF1에 관여하는 *phlR2*의 promoter를 공유하기 때문인 것으로 판단되며 이는 이들의 유전자부위가 중복되는 결과로부터 추정할 수 있을 것이다. 따라서 *phlR2*와 *phlA*는 각각 활성인자(activator)와 억제인자(repressor)를 생성하여 효소의 발현에 영향을 미치고 있는 것으로 사료되는 바이다. PhlA와 PhlR2는

JMP134에서와는 달리 세균의 배경을 달리한 *P. aeruginosa* PAO1c에서 페놀의 존재시에도 불구하고 각각 phenol hydroxylase의 활성을 억제하거나 또는 증가시키지 않고 있는 것으로 나타나 이들의 활성에 영향을 미치고 있는 effector의 존재를 시사하고 있는바, *P. aerugiosa*의 경우 catechol의 *meta*-cleavage pathway 분해경로가 존재하지 않는 것으로 짐작컨데 다른 페놀분해세균의 예에서 볼 수 있듯이 *meta*-pathway의 대사산물이 이들 조절인자를 활성화시키는 effector로 작용할 것이라는 점을 강력히 추측케 하고 있다(20).

PhlR 및 PhlR2와 같은 positive regulator 이외에 GntR 계열의 negative regulator와 많은 유사성을 보이는 ORF2가 페놀대사의 조절에 억제인자로서 역할을 수행할 것으로 사료되고 있다. 페놀과 같은 방향족 화합물을 분해하는 기작에서 negative regulator의 역할은 그리 흔치않은 예이다. 최근에 *R. eutropha* A5에서 biphenyl의 분해와 관련하여 GntR 계열의 negative regulator인 BphR이 보고되고 있다(21). 더 나아가 Teramoto 등에 의하여 *Comamonas testosteroni* R5에서 페놀분해를 담당하는 phenol hydroxylase의 활성을 억제하는 GntR 계통의 negative regulator, PhcS에 대한 보고가 있으므로 해서 페놀과 같은 방향족 화합물의 분해에 negative regulator가 관여한다는 사실이 속속 밝혀지고 있는 실정이다(31). *C. testosteroni* R5의 경우, 페놀분해의 조절기작에 PhcS와 더불어 NtrC 계열의 transcriptional activator인 PhcR도 존재하고 있는 것으로 밝혀져 이와 유사한 조절기작이 JMP134의 페놀분해 조절과정에서도 작동하고 있을 것이라 사료된다. 현재까지 다양한 세균들이 페놀을 분해하고 있는 것으로 보고되고 있으며 이들의 페놀분해 조절기작에 관하여 많은 연구가 진전되어 있으나 두 개의 서로 상반된 조절단백질이 관여하고 있다는 것과 특히 GntR 계열의 negative regulator가 관여한다는 사실은 바로 최근의 *C. testosteroni*의 경우가 최초의 보고이며 따라서 차후 *R. eutropha* JMP134에서 발견된 이와 유사한 조절인자들에 대한 심층연구가 기대되며 이를 통하여 이들 세균들의 진화적 연관성 및 분해기작의 복잡성을 이해하는데 일조할 것이라 사료되는 바이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 핵심연구사업비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로서 이에 깊이 감사드립니다(과제번호: 981-0511-053-2).

참고문헌

1. Antai, S.P. and D.L. Cravford. 1983. Degradation of phenol by *Streptomyces setonii. Can. J. Microbiol.* 29, 142-143.
2. Bartilson, M., I. Nordlund, and V. Shingler. 1990. Location and organization of the dimethylphenol catabolic genes of *Pseudomonas* CF600. *Mol. Gen. Genet.* 220, 294-300.
3. Cuskey, S.M., J.A. Wolff, P.V. Phibbs, Jr., and R.H. Olsen. 1985. Cloning of genes specifying cabohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas Putida. J. Bacteriol.* 162, 865-871.
4. Don, R.H., A.J. Weightman, H.J. Knackmuss, and K.N. Timmis. 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 161, 85-90.
5. Erickson, B.D. and F.J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas strain* LB400. *J. Bacteriol.* 174, 2903-2912.
6. Fürste, J.P., W. Pansegrau, R. Frank. H. Blöocker, P. Scholz, M. Bagdasarian, and E. Lanka. 1986. Molecular cloning of the RP4 DNA primase region in a multirange *tacP* expression vector. *Gene* 48, 119-131.
7. Gurujeyalakshmi, G. and P. Oriel. 1989. Isolation of phenol-degrading *Bacillus steraothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 500-502.
8. Harker, A.R. and Y. Kim. 1990. Trichloroethylene degradation by two independent aromatic-degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1179-1181.
9. Harker, A.R., R.H. Olsen, and R.J. Seidler. 1989. Phenoxyacetic acid degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pathway of the plasmid pJP4: Mapping and characterization of the 2,4-D-regulatory gene, *tfd*R. *J. Bacteriol.* 171, 314-320.
10. Hino, S., K. Watanabe, and N. Takahashi. 1998. Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiol.* 144, 1765-1772.
11. Holloway, B.W., V. Krishnapillai, and A.F. Morgan. 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas. Microbiol Rev.* 43, 73-102.
12. Hughes, E.J. and R.C. Bayly. 1983. Control of catechol *meta*-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus. J. Bacteriol.* 154, 1363-1370.
13. Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1985. Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 163, 863-869.
14. Johnson, L.D. and R.H. James. 1989. Sampling and analysis of hazardous wastes. pp. 13.3-13.44. In H. M. Freeman (ed.), Standard Handbook of Hazardous Waste Treatment and Disposal. McGraw-Hill Book Co., New York.
15. Kaphammer, B., J.J. Kukor, and R.H. Olsen. 1990. Cloning and characterization of a novel toluen degradative pathway from *Pseudomonas pickettii* PKO1, K-145. p.243. Abstr. 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1990. Amermcian Society for Microbiology, Washinton, D.C.
16. Kaphammer, B. and R.H. Olsen. 1990. Cloning and characterization of *tfdS*, the repressor-activator gene of the *tfdB*, from the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid catabolic plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172, 5856-5862.
17. Kim, Y., P. Ayoubi, and A.R. Harker. 1996. Constitutive expression of the cloned phenol hydroxylase gene(s) from *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and concomitant trichloroethylene oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3227-3233.
18. Kim, Y. and A.R. Harker. 1997. Cloning and characterization of the regulatory genes *phlR*1 and *phlR*2 involved in phenol metabolism from *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Mol. Cells* 7, 620-629.
19. Kukor, J.J. and R.H. Olsen. 1990. Molecular cloning, characterization, and regulation of a *Pseudomonas pickettii* PKO1 gene encod-

ing phenol hydroxylase and expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. *J. Bacteriol.* 172, 4624-4630.
20. Lee, C.N., C.L. Poh, and V. Shingler. 1995. Aromatic effector activation of the NtrC-like transcriptional regulator Phhr limits the catabolic potential of the (metyl) phenol degradative pathway it controls. *J. Bacteriol.* 177, 1485-1490.
21. Mouz S., C. Merlin, D. Springael, and A. Toussaint. 1999. A GntR-like negative regulator of the biphenyl degradation genes of the transposon Tn*4371*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 790-799.
22. Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bactera. *Gene* 70, 191-197.
23. Perkines, E.J., M.P. Gordon, O. Caceres, and P.F. Lurquin. 1990. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatecol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172, 2351-2359.
24. Pieper. D.H., K.H. Engesser, and H.J. Knackmuss. 1989. Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* 151, 356-371.
25. Pieper, D.H., W. Reineke, K. Engesser, and H. Knackmuss. 1988. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* 150, 95-102.
26. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. 3nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp1.44-46.
27. Sala-Trepat, J.M., K. Murray, and P.A. Williams. 1972. The metabolic divergence in the *meta*-cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB10015, physiological significance and evolutionary implications. *Eur. J. Biochem.* 28. 347-356
28. Shields, M.S., S.O. Montgomery, S.M. Cuskey, P.J. Chapman, and P.H. Pritchard. 1991. Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1935-1941.
29. Shingler, V., M. Bartilson, and T. Moore. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 175, 1596-1604.
30. Streber, W., K.N. Timmis, and M.H. Zenk. 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169, 2950-2955.
31. Teramoto, M., H. Shigeaki, and W. Kazuya. 2001. PhcS represses gratuitous expression of phenol-metabolizing enzymes in *Comamonas testosteroni* R5. *J. Bacteriol.* 183, 4227-4234.

(Received October 25, 2002/Accepted November 28, 2002)

ABSTRACT: Subcloning and DNA Sequencing of the Phenol Regulatory Genes in *Ralstonia eutropha* JMP134

Keehwang Kim, Subramanian Chitra[1], and Youngjun Kim* (Environmental Biology, Division of Life Science, Catholic University of Korea, Pucheon 420-743, Korea, [1]Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA)

In this study, chromosomal DNA fragment related to the regulation of phenol metabolism in *Ralstonia eutropha* JMP134 was cloned and sequenced. The result has shown that two open reading frames (ORF1 and ORF2) exist on this regulatory region. ORF1, which initiates from 454 bp downstream of the stop codon of the phenol hydroxylase genes, was found to be composed of 501 amino acids. ORF2, whose start codon is overlapped with the stop codon of ORF1, was found to contain 232 amino acids. The comparison of amino acid sequences with other proteins has revealed that ORF1 belongs to the family of NtrC transcriptional activator, whereas ORF2 shares high homology with the family of GntR protein, which is known to be a negative regulator. ORF1 and ORF2 were designated as a putative positive regulator, *phlR2* and a negative regulator *phlA*, respectively. Possible regulatory mechanisms of phenol metabolism in this strain was discussed.