

Comamonas sp. Strain DJ-12로부터 Protocatechuate의 분해에 관여하는 pmcABCDEFT 유전자군의 구조 분석

강철희 · 이상만¹ · 이경² · 이동훈 · 김치경*

충북대학교 자연대 미생물학과, ¹청주대학교 이공대 생명과학과, ²창원대학교 자연대 미생물학과

Comamonas sp. strain DJ-12의 pmcABCDEFT 유전자군은 protocatechuate (PCA)의 분해과정에 관여하는 PCA 4,5-dioxygenase, 4-carboxy-2-hydroxymuconic semialdehyde (CHMS) dehydrogenase, 2-pyrone-4,5-dicarboxylate (PDC) hydrolase, 4-oxalomesaconate (OMA) hydratase, 그리고 4-oxalocitramalate (OCM) aldolase 등의 효소들을 생산하는 유전자들과 transporter의 역할을 하는 유전자로 각각 확인되었다. 이 유전자군은 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 chromosomal DNA로부터 얻은 PCR 산물들을 T-vector에 ligation하여 재조합 플라스미드 pMT1, pMT2, pMT3, pMT4, pMT5, pMT6, pMT7, pMT8, pMT9, pMT10을 제조하였다. 이들 재조합 플라스미드의 염기 서열을 분석한 결과 PCA 4,5-dioxygenase 유전자는 alpha (pmcA)와 beta (pmcB) 두개의 subunit으로 구성 되어있으며, 각각 450 bp와 870 bp이었다. CHMS dehydrogenase 유전자 (pmcC)는 960 bp, PDC hydrolase 유전자 (pmcD)는 918 bp이었으며, OMA hydratase 유전자 (pmcE)는 1029 bp, OCM aldolase 유전자 (pmcF)는 689 bp, 그리고 transporter 유전자 (pmcT)는 1,398 bp이었다. 이들 pmc 유전자들은 pmcT-pmcE-pmcF-pmcD-pmcA-pmcB-pmcC의 순서로 배열되어 있었다. *Comamonas* sp. strain DJ-12의 pmcABCDEFT 유전자산물의 아미노산 서열을 분석한 결과, *Comamonas testosteroni* BR6020 및 *Pseudomonas ochraceae* NGJ1와 94~98%의 높은 유사성을 보였고, 그 유전자들의 배열 순서도 동일하였다. 그러나 *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *Sphingomonas* sp. LB126, 그리고 *Arthrobacter keyseri* 12B와는 아미노산 서열이 52~74%의 유사성을 보였고, 그 유전자의 배열 구조도 상이하였다.

Keywords □ *Comamonas* sp. DJ-12, genetic structure, pmcABCDEFT, protocatechuate(PCA) degradation

Polychlorinated biphenyls (PCBs)는 미생물에 의하여 분해되는 다양한 종류의 분해과정이 연구 보고 되어 있다. 그와 유사한 분해 과정으로 phthalate(4), naphthalene(5), *p*-hydroxybenzoate(6), vanillate(7), *p*-sulfolbenzoate(10), *p*-toluate(11), terephthalate(20) 등의 방향족 오염물질들도 미생물에 의한 분해 연구가 많이 보고 되었다. 이들의 분해 과정에서 protocatechuate (PCA)는 중간 대사물질로 생산되는데, 이 대사물질은 dioxygenase의 촉매에 의하여 PCA의 benzene ring이 다시 개열되어 완전 분해되는 것이다. 그러므로 dioxygenase는 방향족 화합물을 지방족 화합물로 분해시키는 화학반응에 직접적으로 관여하기 때문에, 방향족 오염물질의 분해 정화 측면에서 매우 중요한 효소이다. PCA에 작용하는 dioxygenase는 산소를 결합시키는 탄소의 위치에 따라 PCA 2,3-dioxygenase(25), PCA 3,4-dioxygenase(17) 그리고 PCA 4,5-dioxygenase(1, 13, 16, 21, 24)등 3가지로 분류되는데, 이는 미생물의 종류에 따라 상이하다. Protocatechuate의 분해에 관여하는 유전자군에 관한 연구는 *Pseudomonas ochraceae* NGJ1의 proTHALOaObD (13)과 *Comamonas testosteroni* BR6020의 pmdKEFDABC (18), *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6의 ligIKRJABC (15)와 *Sphingomonas* sp. LB126의 fldBZYWVU

(24), 그리고 *Arthrobacter keyseri* 12B의 pcmRDECAB (4) 유전자군이 밝혀져 있으며, 그 구조와 발현기작에 대한 연구는 부분적으로 보고되어 있다.

Comamonas sp. strain DJ-12 (9)는 4-chlorobiphenyl (4CB)를 분해하여 4-chlorobenzoate(4CBA)를 생성하고 (2), 4CBA는 다시 dechlorination에 의하여 염소를 방출하면서 4-hydroxybenzoate (4HBA)가 생성된 후 다시 protocatechuate가 생성된다는 것이 본 연구자들에 의하여 보고되었다(3).

Protocatechuate는 Fig. 1과 같이 PCA 4,5-dioxygenase에 의해 benzene ring이 개열되어 4-carboxy-2-hydroxymuconic semialdehyde (CHMS)을 형성하며, CHMS는 dehydrogenase에 의해 2-pyrone-4,5-dicarboxylate(PDC)가 되며, PDC는 hydrolase에 의해 분해되어 4-oxalomesaconate (OMA)이 형성되고, OMA는 aldolase에 의해 분해되어 4-oxalocitramalate (OCM)를 형성하게 되고, OCM는 aldolase에 의해서 TCA cycle의 중간체로 완전히 분해되는 과정이 Providenti 등 (18)에 의하여 보고 된 바 있다. 본 연구에서는 *Comamonas* sp. strain DJ-12가 protocatechuate를 PCA 4,5-dioxygenase에 의하여 분해되는 사실을 밝히고, 그 분해 과정에 관여하는 pmcABCDEFT 유전자군을 클로닝하여 그 염기 서열과 함께 유전자 구조를 분석하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-261-2299, Fax: 043-264-9600
E-mail: environ@chungbuk.ac.kr

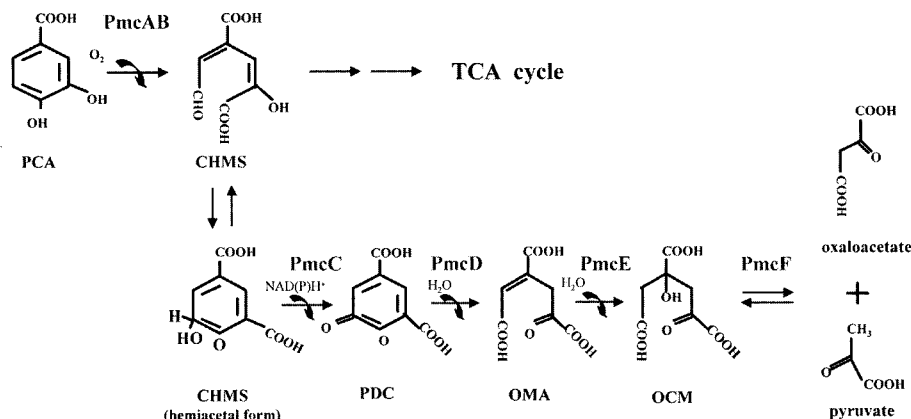


Fig. 1. Degradative pathway of protocatechuate and the genes involved in the degradation. The abbreviations used are PCA: protocatechuate, CHMS: 4-carboxy-2-hydroxymuconic semialdehyde, PDC: 2-pyrone-4,6-dicarboxylate, OMA: 4-oxalomesaconate, OCM: 4-oxalocitramalate, TCA cycle: tricarboxylic acid cycle.

재료 및 방법

실험 균주 및 플라스미드

본 실험에 사용된 *Comamonas* sp. strain DJ-12는 PCA 분해균 주로서 Kim 등 (8)에 의해 대전 공단지역 폐수로부터 분리되었다. 형질 전환을 위한 숙주세균으로 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고, 클로닝 vector로 pGEM[®]-T vector (Promega Co., Madison, USA)를 사용하였다. 각 균주와 재조합 플라스미드의 특성은 Table 1에 기술되어 있다. *Comamonas* sp. strain DJ-12는 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 배지에서 30°C로 배양하였고, 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.

PCR에 의한 *pmcABCDEFT*의 증폭

pmcABCDEFT 유전자들의 클로닝을 위하여 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 16S rDNA 염기서열이 유사하고 protocatechuate를 분해하는 *Comamonas testosteroni* BR6020(18)와 *Pseudomonas ochraceae* NGJ1(13)의 chromosomal DNA로부터 primer를 설계하였으며, 그들의 염기서열 등은 Table 2에서와 같다.

PCR 반응물의 조성은 PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg/ml BSA, pH 8.3), 160 µM dNTPs, 0.3 µM primer, 정제된 DNA (10~15 ng/µl)와 1.5 unit의 *Taq* DNA polymerase를 혼합하여 총 50 µl의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 전처리 한 후, 95°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반응시키고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR product는 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였으며, UltraClean[™] kit (MO BIO)로 정제한 후 -20°C에 보관하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains & plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>Comamonas</i> sp. strain DJ-12	Bacterium which can grow on biphenyl and polychlorinated biphenyl as carbon and energy sources	Kim <i>et al.</i> (8)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Tc ^r , host cell	Stratagene Ltd
Plasmids		
pGEM-T	Ap ^r , cloning and sequencing vector	Promega
pMT1	pGEM-T containing 1.2 kb PCR product of <i>pmcAB</i> (partail)	This study
pMT2	pGEM-T containing 1.7 kb PCR product of <i>pmcAB</i>	"
pMT3	pGEM-T containing 1.9 kb PCR product of <i>pmcDAB</i>	"
pMT4	pGEM-T containing 1.7 kb PCR product of <i>pmcABC</i>	"
pMT5	pGEM-T containing 3.8 kb PCR product of <i>pmcDABC</i>	"
pMT6	pGEM-T containing 2.6 kb PCR product of <i>pmcE</i>	"
pMT7	pGEM-T containing 3.2 kb PCR product of <i>pmcFE</i>	"
pMT8	pGEM-T containing 500 bp PCR product of <i>pmcT</i> (partail)	"
pMT9	pGEM-T containing 3.7 kb PCR product of <i>pmcTEF</i>	"
pMT10	pGEM-T containing 6.8 kb PCR product of <i>pmcTEFDABC</i>	"

*pmcABCDEF*의 클로닝 및 염기서열 결정

pmcABCDEF 유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정하기 위해서 정제된 각각의 PCR 산물은 pGEM[®]-T vector (Promega Co., Madison, USA)에 ligation 시킨 후 Sambrook 등(19)의 방법에 따라 숙주세포인 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환 하였다. 재조합 플라스미드의 분리는 Wizard[®] Plus Minipreps (Promega Co., Madison, USA)을 이용하였고, 염기서열을 결정하기 위한 primer는 pGEM[®]-T vector에 존재하는 T7과 SP6 primer를 이용하여 벡터에 삽입된 유전자의 서열을 양방향으로부터 밝혔다. 재조합 플라스미드에 삽입된 대형 DNA 절편의 염기서열은 이미 밝혀진 염기서열의 끝부분에서 새로운 primer 합성하는 primer walking 방법을 사용하여 결정하였다. Primer의 설계는 primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) 프로그램을 이용하여 길이가 20-mer, 52-54°C의 물리적인 조건을 맞추어 설계하였다. 설계된 primer는 (주) Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며, 염기서열의 결정 및 primer walking은 (주)Bionex (Seoul, Korea)에 의뢰하여 결정하였다.

유전자의 염기서열 내 제한효소의 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(21)와 Clustal X 프로그램 (22)을 이용하였다.

*pmcABCDEF*의 Accession Number

본 연구에서 분석한 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 *pmcABCDEF* 유전자군의 염기 서열 및 아미노산 서열은 GenBank (accession number AY866410)에 등록하였다.

결과 및 고찰

*pmcABCDEF*의 클로닝 및 염기서열

Comamonas sp. strain DJ-12의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 *pmcABCDEF* 유전자군을 증폭할 수 있는 PCR primer (Table 2)를 제조하였고, 그것으로부터 얻은 PCR 산물들은 pGEM[®]-T vector에 삽입하여 재조합 플라스미드 pMT1, pMT2, pMT3, pMT4, pMT5, pMT6, pMT7, pMT8, pMT9, 그리고 pMT10을 제조하였다. 그들의 상대적 크기와 유전자 지도는 Fig. 2에서와 같다.

PCR법으로 증폭한 DNA를 pGEM[®]-Tvector에 삽입하여 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 *pmcABCDEF* 유전자들이 각각 포함된 재조합 플라스미드로부터 각 유전자들의 염기서열을 분석하여 GenBank (accession number AY866410)에 등록하였다. 이들 *pmcABCDEF* 유전자군의 염기서열을 분석한 결과, Table 3에서와 같이 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 *pmcA*, *pmcB*, *pmcC*, *pmcD*, *pmcE*, *pmcF*, 와 *pmcT*의 유전자들은 각각 450, 870, 960, 918, 1029, 689, 그리고 1398개의 염기쌍으로 각각 구성되어 있었다.

Table 2. PCR primers designed for cloning of *pmc* genes

Name	Direction	Sequences (5'-3')	A.T.	Amplified sequence
CH1F	Forward	AACCAGTTCTGCATGAGCCT	53°C	<i>pmcAB</i> (partial region)
CH1R	Reverse	AATCAGCCACATCACCAGC		
CH2F	Forward	AAAAGCTGCTGGTGGACAAC	54°C	<i>pmcAB</i> (full covering region)
CH2R	Reverse	TACCGIATTTGTCGGGCACT		
CH3F	Forward	GTGAAGACGCTGCAGGAGAT	54°C	<i>pmcD</i> (full covering region)
CH3R	Reverse	TATTCCTCTTCGGTCATGCC		
CH4F	Forward	GGTCTTCCTGGTCTACAACGA	53°C	<i>pmcC</i> (full covering region)
CH4R	Reverse	ATCAGTCCGCGTTCAGTTG		
CH3F	Forward	GTGAAGACGCTGCAGGAGAT	53°C	<i>pmcDABC</i> (full covering region)
CH4R	Reverse	ATCAGTCCGCGTTCAGTTG		
CH5F	Forward	ACCATCTGGCGCTTCATTAC	54°C	<i>pmcE</i> (full covering region)
CH5R	Reverse	ATCTCCTGCAGCGTCTCAC		
CH5F	Forward	ACCATCTGGCGCTTCATTAC	54°C	<i>pmcEF</i> (full covering region)
CH7R	Reverse	AGGGGTGTATTTGCCGTTCCG		
CH6F	Forward	CGCGAGACAGGAGATAGAGG	54°C	<i>pmcT</i> (partial region)
CH6R	Reverse	GATGAAGGAACGATTTGCTGT		
CH6F	Forward	CGCGAGACAGGAGATAGAGG	54°C	<i>pmcTEF</i> (full covering region)
CH7R	Reverse	AGGGGTGTATTTGCCGTTCCG		
CH6F	Forward	CGCGAGACAGGAGATAGAGG	54°C	<i>pmcTEFDABC</i> (full covering region)
CH4R	Reverse	ATCAGTCCGCGTTCAGTTG		
PW1F	Forward	CGAACGCAAATACACCCCT	51°C	<i>pmcD</i> (primer working)
PW2F	Forward	CGAGTTCAACATCCAGCAGA	52°C	<i>pmcC</i> (primer working)
PW3F	Forward	GATCATTGCGGTGGGTTACT	52°C	<i>pmcE</i> (primer working)
PW1R	Reverse	TTCTTCAGCCGTCAGTTCT	52°C	<i>pmcE</i> (primer working)

A.T., annealing temperature. Primer sequences are originated from *Comamonas testosteroni* BR6020.

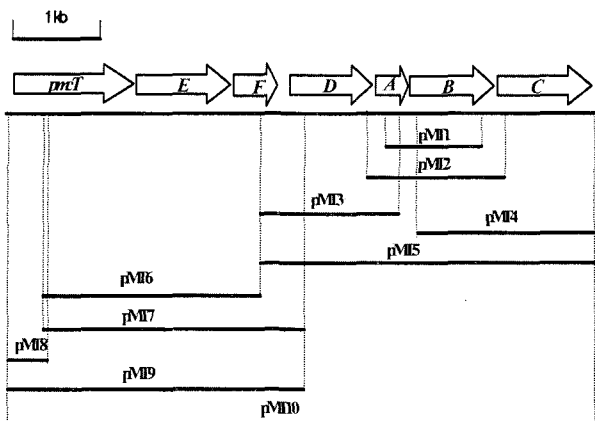


Fig. 2. Genetic structure of pmcABCDEF genes which was identified and cloned from the genomic DNA of Comamonas sp. strain DJ-12.

pmcABCDEF 유전자군의 구조

Comamonas sp. strain DJ-12로부터 클로닝한 pmcABCDEF 유전자들은 각각 PCA 4,5-dioxygenase (pmcAB)와 4-carboxy-2-hydroxyomuconic semialdehyde (CHMS) dehydrogenase (pmcC), 2-pyrone-4,5-dicarboxylate (PDC) hydrolase (pmcD), 4-oxalomesaconate (OMA) hydratase (pmcE), 4-oxalocitramalate (OCM)

aldolase (pmcF)등의 효소와 transporter (pmcT)의 유전자를 암호화하고 있었다. 그리고 이들 유전자들의 배열은 Fig. 3에서와 같이 pmcT-pmcE-pmcF-pmcD-pmcA-pmcB-pmcC 로 되어 있음을 확인하였다. 또 DJ-12 균주의 pmcTEFDABC 유전자들은 Pseudomonas ochraceae NGJ1(13)의 proTHALOaObD 유전자들과 Comamonas testosteroni BR6020(18)의 pmdKEFDABC 유전자들은 93~96%의 높은 유사도를 보였다. 그러나 Sphingomonas paucimobilis SYK-6(15)의 ligIKRJABC 유전자들과 Sphingomonas sp. LB126(24)의 fldBZYWVU 유전자들, 그리고 Arthrobacter keyseri 12B(4)의 pcmRDECAB 유전자들과는 59~72% 정도의 유사도를 보였다.

Comamonas sp. strain DJ-12의 pmcTEFDABC 유전자들이 암호화하는 PmcTEFDABC 효소들의 아미노산의 서열을 Pseudomonas ochraceae NGJ1의 ProTHALOaObD(13)과 Comamonas testosteroni BR6020의 PmdKEFDABC (18)와 비교할 때 Table 4에서와 같이 94~98%의 높은 유사도를 보였으며, 그 유전자의 구조는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 동일한 순서로 배열되어 있었다. 그러나 Sphingomonas paucimobilis SYK-6의 LigIKRJABC(14, 15)와 Sphingomonas sp. LB126의 FldBZYWVU(24) 및 Arthrobacter keyseri 12B의 PcmRDECAB(4) 아미노산들과 비교해 볼 때에는 52~74% 정도의 유사성을 보였으며 (Table 4), 이 유전자들의 배열 구조도 상이하였다.

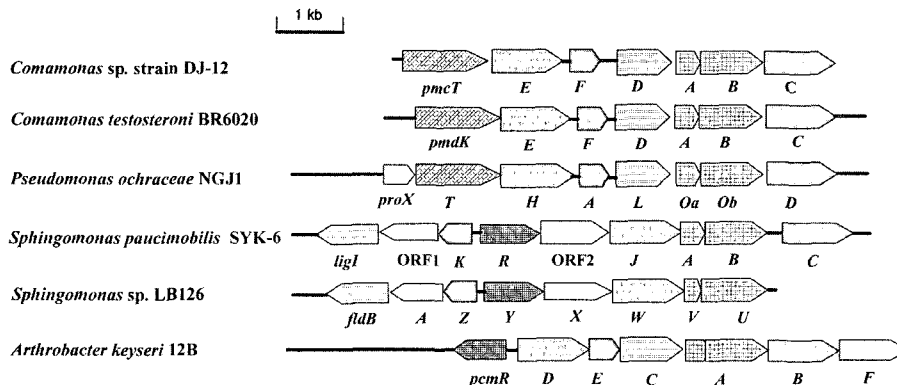


Fig. 3. Genetic organization of the genes for meta-degradation pathway of protocatechuate from Comamonas sp. strain DJ-12 and other reported strains.

Table 3. Summary of the pmcABCDEF gene cluster in Comamonas sp. strain DJ-12

Gene	No. of nucleotide	G+C (%)	Terminal codon	Intergenic space(bp)	No. of amino acids	Putative ribosome binding site	Characteristics
pmcT	1,398	60.8	TGA	-	465	GAGA	Putative transporter
pmcE	1,029	60.2	TAA	40	342	GGAG	OMA hydratase
pmcF	684	64.6	TAA	134	227	GGAG	OCM aldolase
pmcD	918	63.3	TGA	269	305	GAGGA	PDC hydrolase
pmcA	450	62.4	TAA	82	149	AAGGAG	alpha subunit of PCA 4,5-dioxygenase
pmcB	870	61.8	TAA	3	289	AGGAAG	beta subunit of PCA 4,5-dioxygenase
pmcC	960	63.3	TGA	2	319	GGAG	CHMS dehydrogenase

PCA: protocatechuate, CHMS: 4-carboxy-2-hydroxyomuconic semialdehyde, PDC: 2-pyrone-4,6-dicarboxylate, OMA: 4-oxalomesaconate, OCM: 4-oxalocitramalate.

Table 4. Identity of the products of *pmc* genes from *Comamonas* sp. strain DJ-12 compared with corresponding gene products from other strains

Gene	Gene product ¹	Pmd	Pro	Pcm	Lig	Fld
<i>pmcA</i>	<i>alpha</i> subunit of PCA 4,5-dioxygenase	PmdA (97.9) ²	ProOa (98.6)	PcmA (66.1)	LigA (67.1)	FldV (62.9)
<i>pmcB</i>	<i>beta</i> subunit of PCA 4,5-dioxygenase	PmdB (97.2)	ProOb (97.5)	PcmA (63.4)	LigB (63.5)	FldU (56.4)
<i>pmcC</i>	CHMS dehydrogenase	PmdC (94)	ProD (95)	PcmB (66.6)	LigC (73.5)	— ³
<i>pmcD</i>	PDC hydrolase	PmdD (98.1)	ProL (97.1)	PcmC (74)	LigI (54.5)	FldB (52.4)
<i>pmcE</i>	OMA hydratase	PmdE (98.4)	ProH (99.1)	PcmD (71.3)	LigJ (63)	FldW(63)
<i>pmcF</i>	OCM aldolase	PmdF (98.2)	ProA (97.7)	PcmE (60)	LigK (64.1)	FldE (62.9)
<i>pmcT</i>	Putative transporter	PmdK (90.7)	ProT (90.9)	—	—	—

¹PCA: protocatechuate, CHMS: 4-carboxy-2-hydroxylmuconic semialdehyde, PDC: 2-pyrone-4,6-dicarboxylate, OMA: 4-oxalomesaconate, OCM: 4-oxalocitramalate.

²Percentage identity is given at the amino acid level.

³The homology with Pmc from DJ-12 strain was not detected. Pmd is from *Comamonas testosteroni* BR6020; Pro, *Pseudomonas ochraceae* NGJ1; Pcm, *Arthrobacter keyseri* 12B; Lig, *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6; Fld, *Sphingomonas* sp. LB126.

이와 같이 *Comamonas* sp. strain DJ-12 균주의 *pmc* 유전자들의 배열순서뿐 아니라 아미노산 서열이 *Pseudomonas ochraceae* NGJ1(13)과 *Comamonas testosteroni* BR6020(18) 균주들과 매우 유사하다는 점은 이들 균주들의 모두 benzoate와 4-chlorobenzoate 그리고 protocatechuate를 분해한다는 사실과 공통되는 특성인 것이다. 그러나 lignin 과 vanillate를 분해하는 *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6(14, 15)와 phenanthrene과 anthracene을 분해하는 *Sphingomonas* sp. LB126(24) 그리고 phthalate를 분해하는 *Arthrobacter keyseri* 12B(4)와 같이 보다 폭 넓은 기질 특이성을 가진 균주들의 protocatechuate 분해유전자들은 *Comamonas* sp. strain DJ-12의 *pmcTEFDABC*와 비교할 때, 그 배열 순서나 염기서열에 있어 큰 차이가 있었으며, 그들이 분해하는 기질의 범위도 크게 상이하였다. 이와 같은 차이는 *Comamonas* sp. strain DJ-12 균주의 *pmc* 유전자들이 이 균주들의 분해유전자들에 비하여 그 진화 계열이 다르다는 것을 의미하는 것이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 특정기초 연구비(과제번호:R01-2002-000-00022-0)에 의하여 이루어졌으며, 본 저자들은 과학기술부의 국제공동연구사업인 한-이태리 방문연구(과제번호:M60407000003-04A0100-04510)에 따라 본 논문 내용을 적극적으로 검토해 준 이태리 University of Firenze의 Bazzicalupo 교수에게 감사드린다.

참고문헌

1. Arciero, D.M., A.M. Orville, and J.D. Lipscomb. 1990. Protocat-

echuate 4,5-dioxygenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Methods Enzymol.* 188, 89-95.

- Chae, J.C., E.H. Kim, S.H. Park, and C.K. Kim. 2000. Catabolic degradation of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas* sp. DJ-12 via consecutive reaction of *meta*-cleavage and hydrolytic dechlorination. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5, 449-455.
- Chae, J.C., Y. Kim, Y.C. Kim, G.J. Zylstra, and C.K. Kim. 2000. Genetic structure and functional implication of the *pcb* gene cluster for hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Gene* 258, 109-116.
- Eaton, R.W. 2001. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* 183, 3689-3703.
- Goyal, A.K. and G.J. Zylstra. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 230-236.
- Karegoudar, T.B., J.C. Chae, and C.K. Kim. 1999. Catabolism of 4-hydroxy benzoic acid by *Pseudomonas* sp. DJ-12. *J. Microbiol.* 37, 123-127.
- Katayama, Y., S. Nishikawa, M. Nakamura, K. Yano, M. Yamasaki, N. Morohoshi, and T. Haraguchi. 1987. Cloning and expression of *Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in the degradation of vanillate and protocatechuate in *P. putida*. *Mokuzai Gakkai* 33, 77-79.
- 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.
- Lee, J.H., D.W. Park, C.H. Kang, J.C. Chae, D.H. Lee, and C.K. Kim. 2004. Reidentification of *Comamonas* sp. strain DJ-12 and analysis of its *pcbABC2D2* genes responsible for degradation of 4-chlorobiphenyl. *Kor. J. Microbiol.* 40, 121-126.
- Locher, H.H., T. Leisinger, and A.M. Cook. 1991. 4-sulphobenzoate 3,4-dioxygenase: purification and properties of a desulphonative two-component enzyme system from *Comamonas testosteroni* T-2. *J. Biochem.* 274, 833-842.
- Locher, H.H., C. Malli, S. Hooper, T. Vorherr, T. Leisinger, and A. M. Cook. 1991. Degradation of *p*-toluic acid (*p*-toluenecarboxylic

- acid) and *p*-toluenesulphonic acid via oxygenation of the methyl sidechain is initiated by the same set of enzymes in *Comamonas testosteroni* T-2. *J. Gen. Microbiol.* 137, 220-228.
12. Maruyama, K. 1990. Purification and properties of 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase from *Pseudomonas ochraceae* grown on phthalate. *J. Biochem.* 108, 327-333.
 13. Maruyama, K., T. Shibayama, A. Ichikawa, Y. Sakou, S. Yamada, and H. Sugisaki. 2004. Cloning and characterization of the genes encoding enzymes for the protocatechuate *meta*-degradation pathway of *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1434-1441.
 14. Masai, E., S. Shinohara, H. Hara, S. Nishikawa, Y. Katayama, and M. Fukuda. 1999. Genetic and biochemical characterization of a 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid hydrolase involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 181, 55-62.
 15. Masai, E., K. Momose, H. Hara, S. Nishikawa, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2000. Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxy-muconate-6-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 182, 6651-6658.
 16. Noda, Y., S. Nishikawa, K. Shiozuka, H. Kadokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasaki. 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 172, 2704-2709.
 17. Alison, B., L.S. Collier, E.L. Neidle, and M.A. Moran. 2000. Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4662-4672.
 18. Providenti, M.A., J. Mampel, S. MacSween, A.M. Cook, and R.C. Wyndham. 2001. *Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology* 147, 2157-2167.
 19. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 20. Schfli, H.R., M.A. Weiss, T. Leisinger, and A.M. Cook. 1994. Terephthalate 1,2-dioxygenase system from *Comamonas testosteroni* T-2: purification and some properties of the oxygenase component. *J. Bacteriol.* 176, 6644-6652.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Yun, S.H., C.Y. Yun, and S.I. Kim. 2004. Characterization of protocatechuate 4,5-dioxygenase induced from *p*-hydroxybenzoate-cultured *Pseudomonas* sp. K82. *J. Microbiol.* 42, 152-155.
 24. Wattiau, P., L. Bastiaens, R. van Herwijnen, L. Dal, J. R. Parsons, M.E. Renard, D. Springael, and G.R. Cornelis. 2001. Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis. *Res. Microbiol.* 152, 861-872.
 25. Wolgel, S.A., J.E. Dege, P.E. Perkins-Olson, C.H. Jaurez-Garcia, R.L. Crawford, E. Munck, and J.D. Lipscomb. 1993. Purification and characterization of protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*: a new extradiol catecholic dioxygenase. *J. Bacteriol.* 175, 4414-4426.

(Received May 30, 2005/Accepted July 12, 2005)

ABSTRACT: Structure Analysis of *pmcABCDEFT* Gene Cluster for Degradation of Protocatechuate from *Comamonas* sp. Strain DJ-12

Cheol-Hee Kang, Sang-Mhan Lee¹, Kyoung Lee², Dong-Hun Lee, and Chi-Kyung Kim*
(Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ¹Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, and ²Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea)

Comamonas sp. strain DJ-12 is a bacterial isolate capable of degrading of 4-chlorobiphenyl (4CB) as a carbon and energy source. The degradation pathway was characterized as being conducted by consecutive reactions of the *meta*-degradation of 4CB, hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate (4CBA), hydroxylation of 4-hydroxybenzoate, and *meta*-degradation of protocatechuate to product TCA metabolites. The 6.8 kb fragment from the chromosomal DNA of *Comamonas* sp. strain DJ-12 included the genes encoding for the *meta*-degradation of PCA; the genes of protocatechuate 4,5-dioxygenase *alpha* and *beta* subunits (*pmcA* and *pmcB*), 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase (*pmcC*), 2-pyrone-4,6-dicarboxylate hydrolase (*pmcD*), 4-oxalomesaconate (OMA) hydratase (*pmcE*), 4-oxalocitramalate (OCM) aldolase (*pmcF*), and transporter gene (*pmcT*). They were organized in the order of *pmcT-pmcE-pmcF-pmcD-pmcA-pmcB-pmcC*. The amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of *pmcABCDEFT* genes from *Comamonas* sp. strain DJ-12 exhibited 94 to 98% homologies with those of *Comamonas testosteroni* BR6020 and *Pseudomonas ochraceae* NGJ1, but only 52 to 74% with homologies *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *Sphingomonas* sp. LB126, and *Arthrobacter keyseri* 12B.