Article

Pseudomonas alkylphenolica KL28에 존재하는 3종류의 *p*-cresol 분해 경로 및 유전자 발현

성진일 · 이 경* 창원대학교 생명보건학부

Identification of three pathways for *p*-cresol catabolism and their gene expression in *Pseudomonas alkylphenolica* KL28

Jin Il Sung and Kyoung Lee*

Department of Bio Health Science, Changwon National University, Gyeongnam 51140, Republic of Korea

(Received August 24, 2016; Revised September 9, 2016; Accepted September 9, 2016)

ABSTRACT: Previously our laboratory showed that *Pseudomonas alkylphenolica* KL28 possesses two different *lap* and *pcu* gene clusters for *p*-cresol catabolism. In this study, additional gene cluster (*pchACXF-pcaHG*-orf4-*pcaBC*) has been identified to encode enzymes necessary for catabolism of *p*-cresol to β -carboxy-*cis,cis*-muconate. This gene cluster showed almost identical nucleotide sequence homologies to those in the plasmid of *Pseudomonas putida* NCIMB 9866 and 9869, British origins, indicating the possibility of a horizontal gene transfer. Through mutagenesis of each gene cluster and *gfp*-based promoter reporter assays, it has been shown that the three gene clusters are functionally operated and *pch* genes are induced by *p*-cresol. Furthermore, the *pcu* gene cluster of the three was shown to be dominantly expressed in utilization of *p*-cresol. Mutation of the *pcu* gene was defective in aerial structure formation under *p*-cresol vapor, indicating the utilization rate of carbon source is one of key elements for the multicellular development of this strain.

Key words: Pseudomonas alkylphenolica, catabolism, p-cresol, isoenzyme

p-Cresol은 4-메틸 페놀로 수지의 합성, 소독제 및 공업용용 매로 사용되어 왔다. *p*-Cresol은 전세계적으로 광범위하게 사 용되는 항산화제 butylated hydroxytoluene의 전구 물질이며, 향수 생산 및 염색 산업에서 넓게 사용되고 있다(Joesaar *et al.*, 2010). 또한 원유, 석탄 타르 및 자동차 대기가스 및 담배 연기 에도 포함되어 있다. 자연계에서는 미생물의 활동에 의해 생 산된다. 예를들면 이 화합물은 인간 장내 미생물의 방향족 아 미노산 발효를 통해 생산되어 대변이나 오줌으로 배출되며, 땀의 성분으로 암컷 모기의 유인 물질로 작용한다. 또한 돼지 사육장의 불쾌한 'pig odor'의 주요 물질로 알려져 있다(Yan *et al.*, 2016). 요독증(uremia) 환자는 *p*-cresol에 대해 높은 독성 을 가지며, *p*-cresol에 장기간 또는 과량으로 노출되면 인체에 유해한 것으로 알려져 있다(Chang *et al.*, 2014).

세균에 의한 p-cresol의 호기적 분해에는 2가지 경로가 잘 알려져 있다(Bayly et al., 1966). 첫째는 활성자리에 flavin을 포함하는 단일 성분의 산화효소 또는 활성자리에 di-iron을 포 함하는 다성분 산화효소에 의해 p-cresol의 벤젠고리의 산화 로 4-methylcatechol로 전환되어 meta 분해를 통해 TCA 회로 로 유입되는 경로이다(Fig. 1). 전자는 Pseudomonas pickettii PKO1의 tbuD 유전자에 암호화된 효소(Kukor and Olsen, 1992), 후자는 Pseudomonas putida CF600 균주의 dmpKLMNOP 유전자에 암호화되어 있는 다성분 산화효소가 대표적인 예 이다(Shingler et al., 1992). 두 번째 분해 경로는 p-cresol의 메틸기가 산화되는 경로로 이 경우 p-cresol은 p-cresol methylhydroxylase와 p-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소에 의해 phydroxybenzoate로 전환되고, 이렇게 형성된 p-hydroxybenzoate 는 flavin을 포함하는 p-hydroxybenzoate 산화효소에 의해 protocatechuate로 전환되고, protocatechuate는 pcaHG에 암호 화되어 있는 protocatechuate 3,4-dioxygenase에 의해 ortho 분

^{*}**For correspondence.** E-mail: kyounglee@changwon.ac.kr; Tel.: +82-55-213-3486; Fax: +82-55-213-3480

해 경로를 따라 TCA 회로로 유입된다(Dagley and Patel, 1957) (Fig. 1). *p*-Cresol methylhydroxylase와 *p*-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소를 암호화하는 유전자는 *Pseudomonas*에서 잘 보존 되어 있으며 하나의 오페론으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이 오페론은 *Pseudomonas putida* NCIMB 9866와 NCIMB 9869 에는 *pchACXF* (Kim *et al.*, 1994)와 *Pseudomonas mendocina* KR1 (Wright and Olsen, 1994), *Pseudomonas fluorescens* PC18 과 PC24 경우는 *pcuCAXB* (Joesaar *et al.*, 2010)로 명명되어 있다. *pchA/pcuC*는 *p*-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소를 암호화하고 *pchCF/pcuAB*는 *p*-cresol methylhydroxylase을 암호화하는 것으로 알려져 있다(Fig. 2). 후자의 경우 α₂β₂의 4 차 구조를 갖고 있으며 큰 subunit은 FAD을, 작은 subunit은 cytochrome c를 함유하는 주변 세포질(periplasmic) 단백질로 알려져 있다(Cunane *et al.*, 2000). *pchX/pcuX*를 암호화하는 단 백질의 기능에 대해서는 알려지지 않았다. *P. mendocina* KR1, *P. fluorescens* PC18과 PC24 균주의 프로모터는 sigma-54와 이들 유전자군과는 반대 방향으로 전사되는 XyIR-형의 전사 조절자(*pcuR*)에 의해 발현의 조절을 받는 것으로 알려져 있다 (Joesaar *et al.*, 2010).

P. alkylphenolica^T KL28은 창원의 공장 주변 하천 토양에



Fig. 1. Catabolism of *p*-cresol by *P. alkylphenolica* KL28. In this strain, three independent initial degradation enzymes encoded by *lap*, *pch*, and *pcu* gene clusters are involved in the catabolism of *p*-cresol. PCMH, *p*-cresol methylhydroxylase; PHBDD, *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase.



Fig. 2. The *pcu* and *pch* gene clusters in *P. alkylphenolia* KL28. The *pch* gene cluster from *P. putida* NCIMB 9866 is also shown for comparison. A black bar in each gene cluster denotes the deleted portion in the mutant. The restriction sites discussed in the text for mutagenesis are also indicated.

서 분리된 기존 P. alkylphenolia가 새롭게 명명된 신종으로, mucA 변이주는 의학적으로 중요한 polymannuronate 다당체 를 대량 생산하는 그람 음성 세균이다(Veeranagouda et al., 2011; Mulet et al., 2015). 이 균주는 p-cresol을 공기 중으로 공 급하면 초기 5-10일 정도까지는 반구(dome) 형태의 집락을 형 성하다가, 이후에는 반구에서 높이가 2-4 mm되는 잔가지를 갖는 버섯 모양의 구조체를 형성하는 특별한 발달 단계를 갖 는 세균이다. 이 3차원 세포 구조를 공중체(aerial structure)라 명명하였다(Lee and Veeranagouda, 2009; Veeranagouda et al., 2009, 2011). 이 균주는 para 또는 meta 위치에 알킬 그룹 (C1-C5)을 갖는 페놀을 대사할 수 있으며, 이들 화합물은 lap-유전자군에 암호화되어 있는 Lap 분해 경로에 의해 대사된다 (Jeong et al., 2003). lap 유전자군의 구성 유전자 분포는 단순 페놀 분해균인 P. putida CF600에서 발견된 유전자군(dmp) 내 의 유전자와 조성과 순서에서 차이가 있으며, 개별 유전자의 subcloning을 통한 효소의 기질 특이성 연구에서도 기존 효소 와 차이가 있음을 알 수 있었다(Kim et al., 2005; Cho et al., 2009). 또한 기존연구에서 gfp 유전자를 포함하는 신규 트랜스 포존을 사용하여 p-cresol를 p-hydroxybenzoate로 분해 할 수 있는 pcuRCAXB를 동정하였으며, 이 유전자군은 액체 배지에 서보다 한천배지에서 더 많이 발현되는 것을 보였다(Cho et al., 2011).

본 연구에서는 *P. alkylphenolica* KL28 균주에 존재하는 *p*-cresol의 초기 대사에 관여하는 기존에 알려진 *lap*과 *pcu* 유 전자군과 다른 *pch* 유전자군을 동정하였으며, 변이주 및 프로 모터의 레포터(reporter) 발현 분석을 통해 이들 3개 유전자군 이 *p*-cresol 대사에 관여하는 것을 밝힐 수 있었다.

재료 및 방법

균주와 배지

P. alkylphenolica KL28 (KCTC 22206) 균주는 복합배지로 LB 배지 또는 무기영양배지로 mineral salts basal medium (MSB) (Stanier *et al.*, 1966)을 사용하였다. 배양 온도는 28°C 이였다. 변이주의 성장 정도 및 *gfp* 레포터 유전자의 발현을 실 험하기 위해서는 2.5 mM 탄소원(*p*-cresol, *m*-cresol과 포도당) 을 포함하는 50 ml의 MSB 배지를 250-ml Erlenmeyer 플라스 크에 첨가하여 회전식 교반기에서 160 rpm으로 배양하였다. 이때 LB 액체 배지에서 밤샘 배양한 배양액 20 μl를 접종하여 주어진 배양시간에 따라 시료 채취 후 OD₆₆₀과 GFP 발현량을 측정하였다. *Escherichia coli*는 37°C에서 LB 배지를 이용하 여 배양하였다. 필요한 경우 배지에 한천을 1.5% 첨가하여 한 천 배지를 만들거나, 세포 내 플라스미드의 유지를 위해서는 필요한 항생제를 기존에 사용한 농도로 배지에 첨가하였다 (Yun *et al.*, 2007).

유전자 조작 및 유전자 상동성 비교

P. alkylphenolica로부터 염색체 분리, 제한 효소의 소화, 접 합(conjugation) 및 PCR은 기존 실험 방법을 준수하였다(Lee et al., 2014). P. alkylphenolica의 유전체의 염기 서열로부터 필요한 유전자 정보를 회수하였으며, Bioedit 프로그램의 BLOSUM62 score matrix (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/ page2.html)를 이용하여 전사된 단백질 아미노산 서열의 상동 성을 조사하였다. P. alkylphenolica KL28의 유전체의 서열은 NCBI 참고 번호 NZ_CP009048.1이다. KEGG 데이터베이스 (http://www.genome.jp/kegg)를 이용하여 특정 단백질에 대 한 ortholog와 paralog 단백질을 검색하였다. 유전자 지도는 SimVector 4 프로그램을 사용하여 제작하였다.

P. alkylphenolica KL28 △ lapB 변이주의 제작

JJC230xmaF (ATACCCGGGATGGCGATGACAG)와 JJC230hindR (GGCAAGCTTTCAGGTCACAACG) 프라 이머를 이용하여 1 kb lapB 단편을 PCR 증폭하였다. 이를 pGEM-T easy 벡터(Promega Co.)에 클로닝하였으며, lapB 단 편의 가운데에 존재하는 Pstl 자리에 전사 종결이 제거된 테트 라시클린 내성 유전자인 Tc2 유전자를 클로닝하여 pGEM-T easy-lapB::Tc2를 제작하였다. Tc2 유전자 카세트는 기존 p34S-Tc2 (Veeranagouda et al., 2011) 로부터 PstI 소화 후에 회수하 였다. 다음으로 pGEM-T easy-lapB::Tc2 벡터를 HindIII/EcoRI 으로 소화한 후에 Pseudomonas에서는 복제가 되지 않는 자살 벡터인 pK18mobsacB (Schafer et al., 1994)의 같은 제한효소 자리에 클로닝하여 pK18mobsacB-lapB::Tc2를 제작하였다. E. coli DH5α에 존재하는 pK18mobsacB-lapB::Tc2를 조력자 E. coli DH5α (pRK2013)를 이용하여 3균주의 짝짓기(triple mating)를 통해 P. alkylphenolica KL28에 접합으로 도입한 후 암피실린과 테트라시클린을 포함하는 LB 배지에 도말하여 P. alkylphenolica KL28lapB::Tc2(ΔlapB)를 선별하였으며 PCR 을 통해 변이주를 확인하였다(Lee et al., 2014).

P. alkylphenolica KL28 △ *pcuB*와 △ *lapB* △ *pcuB* 변이주의 제작

gfp를 갖는 신규 트랜스포존으로 제작된 P. alkylphenolica

CI5 변이주(Cho et al., 2011)에서 염색체를 회수 후 NruI으로 소화하여 E. coli의 oriR6K 복제기점을 갖는 self-ligation된 플 라스미드인 pSH5를 제작하였으며, 이를 Sall 소화 후에 2.5-kb 의 pcuB를 포함하는 부분을 회수하여 Tc 유전자 카세트를 Sall 소화로 제거한 p34S-Tc (Dennis and Zylstra, 1998)에 클로닝 하였다. 이렇게 만들어진 p34S-pcuB를 EcoRI 소화와 selfligation을 통해 pcuB 유전자 내부의 EcoRI을 포함하는 단편 (Fig. 2)을 제거하였다. 이 벡터를 다시 Sall으로 소화하여 내부 가 제거된 pcuB 유전자를 회수하여 pK18mobsacB의 SalI에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 벡터는 pK18mobsacB∆pcuB 라 명명하였으며 위에서 언급한 방법과 같이 3균주 짝짓기를 통한 접합으로 KL28 군에 도입하여 이중 교차(double crossover) 변이주를 선별하였다. KL28 균주에서 pcuB가 제거된 것을 PCR로 확인하였으며 pcuB가 제거된 부위는 Fig. 2와 같다. 또 한 pK18mobsacB Δ pcuB를 Δ lapB 변이주에 도입하여 Δ lapB Δ pcuB 변이주를 제작하였다.

P. alkylphenolica KL28∆lapB∆pcuB∆pch 변이주의 제작

p-Cresol 분해 유전자를 탐색하기 위해 pLAFR3에 클로닝 되어 있는 KL28 균주의 유전자 library를 *P. putida* G7.C-1 접 합으로 도입 후*p*-cresol에 성장하는 형질 전환주를 분리하였 다(Jeong *et al.*, 2003). *P. putida* G7.C-1은*p*-cresol을 탄소원 으로 이용하지 못한다. 하나의 형질 전환주로부터 플라스미드 를 회수하였으며 *Hin*dIII 소화 후에 6.8 kb 단편(Fig. 2)을 pUC19 (NEB Lab, Co.) 벡터에 클로닝하였다. 이렇게 제작한 벡터를 다시 *BgI*II로 소화하여 2.6 kb 내에 존재하는 *pchApchF*의 일부를 제거하였다(Fig. 2). Self-ligation 후에 *Bam*HI 과 *Eco*RI 소화하여 획득한 1.6 kb의 단편을 pK18mobsacB에 클로닝하여 접합으로 위에서 제작한 KL28Δ*lapB*Δ*pcuB* 변이 주에 도입 한 후에 이중 교차 변이주를 선별하였으며 이를 통 해 KL28Δ*lapB*Δ*pcuB*Δ*pccb*를 제작하였다.

GFP 발현 레포터 벡터의 제작 및 GFP 발현의 측정

유전자 *pchA*의 프로모터 부위를 P_PchAF_H (CTGAAGC TTAGCGTACCGCTGTAG)와 P_PchAR_E (ACGGAATTC ACCGGCGATCAGTAG) 프라이머를 사용하여 0.6 kb를 PCR 로 증폭한 후에 pGEM T-easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 확인하였다. 이를 다시 *Hin*dIII/*Eco*RI 소화 후에 *gfp* 유전자를 레포터로 갖는 프로모터 탐색 벡터 pPROBE-GT (Miller *et al.*, 2000)에 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 벡터를 p*pchA_p-gfp* 라 명명하였으며 접합으로 *P. alkylphenolica* KL28에 도입하 여 여러 탄소원에 대한 gfp 발현량을 조사하였다. 염색체의 pcuB 유전자에 gfp를 포함하는 트랜스포존 변이주 CI5 (Cho et al., 2011)는 pcu 오페론의 프로모터가 pcuC 유전자 앞에 존 재하므로 본 논문에서는 P. alkylphenolica KL28 (CpcuCp-gfp) 균주로 명명하였다. 또한 기존에 구축된 lap 프로모터의 gfp 레포터인 pJJR1 (Jeong et al., 2003)은 위의 레포터 벡터와 쉽 게 비교하기 위해 plapBp-gfp라 다시 명명하였다. GFP 형광 발 현을 측정하기 위해 세포를 원심분리로 회수하여 OD₆₆₀이 0.1 이되게 멸균된 식염수로 조정한 후 분광형광계(Shimadza Co., model RF-5391PC)를 사용하여 450 nm 빛을 조사하여 509 nm에서 발생하는 형광량을 측정하였다. 이때 빛의 조사와 형 광량 검출을 위한 파장의 범위(split)는 모두 3 nm이였다. 세포 단위가 갖는 형광의 양은 specific GFP로 계산하였으며 이는 측정한 형광량을 OD₆₆₀값으로 나누어 계산하였다.

결과 및 고찰

P. alkylphenolica KL28 유전체에 존재하는 *p*-cresol 대사 유전자의 특성

본 연구실에서는 P. alkylphenolica KL28 균주의 p-cresol 분해 유전자 군으로 lap과 pcu 유전자군을 동정하였다(Jeong et al., 2003; Cho et al., 2011). lap 유전자군은 p-cresol 뿐 아니 라 알킬 체인의 탄소 수가 5개까지도 수용 가능한 다양한 분자 량의 알킬 페놀류를 분해하는 것으로 알려져 있다. 이 Lap 분 해 경로는 lapKLMNIOP (유전체 tag 번호, PSAKL28_05870~ PSAKL28_05920) 유전자에 의해 암호화되어 있는 다성분 phenol hydroxylase (Lee, 2013)에 의해 알킬페놀이 4-alkylcatechol 로 전환되고 extradiol catechol dioxygenase (lapB, PSAKL28_ 05860)에 의해 방향족 고리의 meta 분해를 통해 더욱 분해되 는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). P. alkylphenolica KL28 균주의 pcu 유전자군(pcuRCAXB, PSAKL28_20230~20190)은 조절 유전자를 포함하여 p-cresol을 p-hydroxybenzoate로 분해하는 유전자만 독립적으로 존재하고 있어, 기존에 밝혀진 p-cresol 분해 유전자군과는 차이가 있음을 알 수 있었다.

최근에 밝혀진 *P. alkylphenolica* KL28 균주의 유전체 분석 을 통해 유전자 부위 PSAKL28_31420~31340에 *p*-cresol을 protocatechuate를 통해 β-carboxy-*cis*,*cis*-muconate로 전환을 촉매 할 수 있는 효소를 암호화하는 유전자군(*pchACXF-pcaHG*orf4-*pcaBC*)이 존재하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 본 유전자 군 내에 존재하는 *p*-cresol을 *p*-hydroxybenzoate로 분해하는 유전자를 *pcu* 유전자군과 구분하기 위해 *pchACXF*로 명명하

였다. 이 유전자군은 최근에 밝혀진 P. putida NCIMB 9866의 85-kb의 pRA4000 플라스미드에 존재하는 염기서열과 100%, P. putida NCIMB 9869의 pRA500의 유전자와는 99% 상동성을 보 였다. 그러나 NCIMB 9866 유전자 군 내에는 P. alkylphenolica 유전자군과 달리 기능이 알려져 있지 않은 orf3 유전자가 pchF 유전자 다음에 삽입되어 있다(Chen et al., 2014)(Fig. 2). 참고 로 P. alkylphenolica KL28 내에는 플라스미드가 존재하지 않 는다. P. putida NCIMB 9866과 9869 균주는 P. J. Chapman 박 사가 1966년 영국의 Hull 대학교의 강변에서 분리한 균주이다 (NCIMB culture collection). 기원이 다른 Pseudomonas 사이 에 존재하는 pch 유전자의 높은 상동성은 이들 유전자 군이 진 화적으로 멀지 않은 시간에 종간 이동(horizontal gene transfer) 이 있었다는 것을 알려주고 있다. 이들 유전자군 외부에 tnpA (transposase)와 tnpR (resolvase) 이 존재하고 있어 이들 유전자 의 전달을 용이하게 하였을 것으로 추정된다(Fig. 2). 반면에 전 사된 단백질의 아미노산 서열에서 PcuC/PchA, PcuA/PchC, PcuX/PchX, PcuB/PchF는 각각 79.0, 59.0, 48.7과 79.9% 의상 동성을 보여, pch와 pcu 유전자들은 보다 오랜 시간 독립적으 로 존재해온 것으로 판단된다.

P. alkylphenolica KL28 유전체를 분석을 통해 그 외 p-cresol 대사에 관여하는 p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase를 암 호화하는 pobA (PSAKL28 20260)를 확인할 수 있었고, protocatechuate 3,4-dioxygenase (pcaHG)의 작용에 의해 생성 된 β-carboxy-cis, cis-muconate를 succinyl-CoA와 acetyl-CoA 로 전환하는 β-ketoadipate 분해 경로의 나머지 효소를 암호화 하는 독립된 유전자군 pcalJFTBDC (PSAKL28 09980~10040) 을 확인할 수 있었다. β-Ketoadipate 대사에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자군은 세균에 따라 다양한 유전자 조합을 갖 고 있다. P. alkylphenolica KL28에서 발견되는 유전자 조합은 P. aeruginosa PAO1과 동일한 유전자 순서를 갖고 있는 것을 알 수 있었다(Li et al., 2010). 이상의 결과에서 보면 KL28 균 주는 p-cresol을 이용하는 하기 위해 lap 유전자군을 이용한 meta 분해 경로와 β-ketoadipate 분해 경로를 동시에 갖고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 1). 더욱이 p-cresol을 p-hydroxybenzoate 로 대사하기 위해 2가지의 서로 다른 유전자 군을 갖고 있는 것 을 알 수 있었다.

lap, pcu, pch 유전자의 p-cresol 대사에서 역할 및 발현 특성

p-Cresol 분해에 이들 3개 유전자군의 역할을 알아보기 위 해 재료 및 방법에서처럼 각 유전자군의 변이주를 제작하여*p*-및 *m*-cresol을 탄소원으로 첨가한 MSB 배지에서 성장 유형을 살펴보았다(Fig. 3). *p*-Cresol을 탄소원으로 제공한 경우 *lap*

유전자가 결손된 변이주는 모균과 동일한 성장을 보였다. 이 때 배가시간(doubling time)은 약 3.2 시간이였다. 그러나 pcuB 변이주의 배가시간은 약 5.6시간으로 p-cresol을 탄소원으로 이용하지만 성장이 지연되는 것을 알 수 있었다. lapB와 pcuB 동시 변이주는 pcuB 변이주보다 낮은 광학밀도를 유지하였지 만 거의 동일한 성장을 보였다. 그러나 lapB/pcuB/pch 변이주 는 p-cresol에서 성장을 보이지 않았다(Fig. 3A). 기존 연구에 서 전체 lap 유전자군을 포함하는 P. putida G7.C-1(pJJ2)가 p-cresol에 대한 성장을 획득하였고(Jeong et al., 2003), catechol 류의 meta 분해에 의해 생기는 연노랑색이 p-cresol을 포함하 는 배양액에 축적되는 것이 관찰되었다(Cho et al., 2011). 따 라서 lap 유전자군도 p-cresol의 분해에 관여하는 것을 알 수 있 었다. 그러나 lap 변이주가 모균과 유사한 성장 속도를 보이는 것으로 보아 lap 유전자군은 액체배지에서 p-cresol 분해에 크 게 기여하지 않는 것으로 보였다. p-Cresol의 구조 이성질체 인 m-cresol은 모균과 lapB 유전자가 변이되지 않은 균주에서 만 성장을 하는 것으로 보아 *m*-cresol은 *lap* 유전자군에 절대 적으로 의존하는 것을 다시 확인할 수 있었다. 이때 배가시간 은 약 7.2시간이였다(Fig. 3B).

액체배지 배양시 유전자의 발현 정도를 비교하기 위해 gfp 레포터 벡터를 사용하여 p-cresol 분해 유전자군의 발현 특성 을 살펴보았다(Fig. 4). pch 유전자는 포도당을 탄소원으로 이 용할 경우 미량 발현되는 반면, p-cresol에 의해 강하게 발현되



Fig. 3. Growth of *P. alkylphenolica* KL28 and its mutants in the presence of 2.5 mM*p*-cresol (A) and *m*-cresol (B). Experiments were performed in triplicate. The results are mean values and standard deviations were less than 10%.

는 것을 알 수 있었고, 포도당에 의해 *p*-cresol에 의한 발현이 부분적으로 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 4에는 표 시하지 않았지만 *p*-cresol을 탄소원으로 사용한 MSB 한천배 지에서 specific GFP의 발현은 약 5.5 수준으로 *pch* 유전자가 거의 발현되지 않는 것을 알 수 있었다. 이 값을 액체 배지에서 32.7의 값과 비교하면 *pch* 유전자군은 액체에서 더 많이 발현 되는 것을 알 수 있었다. *pch* 유전자군 *m*-cresol에 의해 유도되 지 않았다. 따라서 *pch* 유전자군은 *pcu* 유전자군과는 달리 고 체배지에서 보다 액체배제에서 더 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. *P. alkylphenolica* KL28의 *lap*과 *pcu* 프로모터 부위에 는 LysR/XylR-형의 transcriptional regulator를 암호화하는 유



Fig. 4. Specific GFP values from *P. alkylphenolica* containing *gfp* reporters at the culture times of 24 and 48 h. The *gfp* genes under the *pchA* and *lapB* promoters are in plasmid (pProbe-GT) but that under the pcu promoter is in chromosome. They are named $ppchA_p$ -*gfp*, $plapB_p$ -*gfp*, and $CpcuC_p$ -*gfp*, respectively. The carbon sources used were Glc (glucose), *p*-cresol and *m*-cresol at the concentration of 2.5 mM. Each data represents three independent experiments with average and standard deviation values.

전자가 존재하며, sigma-54 조절자의 -12/-24의 결합 자리가 보존되어 있다. 하지만 *pchC* 유전자 프로모터에는 이들이 관 찰되지 않아 *pch* 유전자군의 발현은 *pcu/lap* 유전자 군과 다른 조절 단백질로부터 발현 조절을 받는 것으로 추정되며, 향후 조절 단백질의 동정 및 조절 기작에 대한 추가 연구가 진행될 예정이다.

액체 배지에서 p-cresol에 의한 lap 유전자의 발현은 pch 유 전자 발현의 약 51.5%이므로 다소 약하게 발현되는 것을 알 수 있었다. pcu 유전자의 발현은 벡터가 아닌 유전체에 gfp 유전 자가 삽입되어 있어 측정된 값으로 상대적 비교는 어렵지만, lap과 pch 발현에 사용된 pPROBE-GT 벡터는 pACYC184의 복제 기점(pVS1/p15a replication origin)을 사용하므로 대장 균 세포에는 18개 복제가 존재하는 것으로 알려져 있다(Chang and Cohen, 1978). 이를 고려하면 액체 배지에서도 pch와 lap 유전자보다 pcu가 높게 발현되는 것을 예측할 수 있었다. 또한 pcu 유전자를 변이시키면 lap 유전자를 변이시킬 때보다 성장 의 저해가 높게 나타나는 것으로 보아 액체 배지에서도 pcu 유 전자의 발현이 p-cresol 분해에 큰 역할을 하는 것을 알 수 있었 다(Fig. 3).

고체 배지에서 각유전자군에서 나오는 GFP의 발현뿐 아니 라 pcu 변이주에 의한 공중체 형성 여부를 부가적으로 조사하 였다. MSB 한천 배지에 각 균주를 도말한 후 Duran관 속의 솜 에 p-cresol을 첨가하여 파라필름으로 밀봉한 페트리디쉬에 한 달 동안 배양한 결과는 Fig. 5와 같으며, GFP는 lap → pch → pcu 순으로 높게 발현되는 것을 알 수 있었다. 특히 앞에서



Fig. 5. Photographs showing the levels of GFP expression from the promoter reporters following incubation at 25°C for one month. The tubes contain cotton with 50 μ l *p*-cresol for vapor supply. The diameter of the tubes is 6 mm. The insets are enlarged photographs of aerial structures formed under each tube. All photographs were taken under a UV light at 366 nm from the top of the plates using a Nikon SMZ1500 stereomicroscope.

언급했듯 *lap*과 *pch*의 *gfp* 레포터 유전자가 벡터에 클로닝된 것과 달리*pcu* 유전자의 *gfp* 레포터는 염색체에 삽입되어 있는 것을 고려하면, *pcu* 유전자가 *pch*와 *pcu*에 비해 월등히 높게 발현되는 것을 알수 있었다. 또한*pcu* 유전자가 결핍되면 미세 가지를 갖는 완성된 버섯모양의 공중체는 형성되지 않고 바닥 에서 반구 형태의 표면이 부드러운 집락이 형성되었다(Fig. 5). 이는 *pcu* 유전자의 기능이 저해됨에 따라 *p*-cresol의 이용 속 도가 줄었기 때문으로 분석되었다. 따라서 버섯형태의 3차구 조 형성은 탄소원의 이용 속도와도 밀접한 관계가 있음을 암 시하였다.

P. alkylphenolica KL28의 다양한 p-cresol 분해 경로의 활용

본 연구 결과를 통해 3개의 p-cresol 분해 유전자군이 P. alkylphenolica KL28에 존재하며 기능적으로 작용하는 것을 보였다. 같은 탄소원에 대해 2개의 분해 경로를 갖는 균주는 드 물게 발견되나 3가지의 분해 경로를 갖는 균주는 흔하지 않다 (Naessens and Vandamme, 2003). P. alkylphenolica KL28 내 에 p-cresol을 이용하는 다양한 분해 경로가 존재하는 것은 변 화하는 환경에 적응하면서 주어진 탄소원을 효율적으로 사용 하기 위한 것으로 여겨진다. 이를 뒷받침하기 위한 예로 P. alkylphenolica KL28의 pcu 유전자는 액체 배지에서보다 한천 배지에서 월등히 높게 발현되는 것을 보였다(Cho et al., 2009). 이번 연구 결과에서는 pch 유전자군은 고체 배지 보다는 액체 배지에 더 많이 발현되는 것을 알 수 있었다. P. alkylphenolica 는 보다 빠른 기질의 이용을 위해 meta와 ortho 분해 경로 뿐 아 니라, ortho 분해 경로를 위해 pch와 pcu 유전자를 동시에 갖도 록 진화한 것으로 추정이 된다(Fig. 1). 또한 pcu와 pch에서 발 현되는 p-cresol methylhydroxylase와 p-hydroxybenzaldehyde 탈수소효소는 같은 반응을 촉매하는 isozyme으로 두 종류의 효소는 반응학적인 측면(Km과 Vmax 등)에서 차이가 날 수 있 어, P. alkylphenolica KL28는 다양한 농도가 주어지는 환경에 서 효율적으로 p-cresol을 탄소원 및 에너지원으로 사용 가능할 것으로 추정 된다. 또한 p-cresol methylhydroxylase 인 PcuAB 와 PchCF subunit 간의 치환이 가능하다면 4가지 형태의 조합 을 갖는 효소 생산이 가능하다. 특히 p-cresol은 미생물 소독제 로 미생물에 높은 독성을 보인다. p-Cresol 분해를 위한 다양한 효소의 발현은 기질의 무독화에도 크게 기여할 것으로 간주된 다. P. alkylphenolica KL28은 건조에 내성을 갖는 공중체를 형성하므로 돼지 사육장이나 p-cresol이 방출되는 대기 환경 을 정화하기 위한 필터 첨가제 등 생분해 목적으로 응용될 수 있으며, p-cresol 생분해 효율을 3종류 유전자군의 과발현을 통해 더욱 증대시킬 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 p-cresol 초기 분해에 관여하는 기존의 lap 과 pcu 유전자군 외에 새로운 pch 유전자군을 Pseudomonas alkylphenolica KL28로 부터 동정하였다. 이 유전자군(pchACXF*pcaHG*-orf4-*pcaBC*) ^e *p*-cresol ^e β-carboxy-*cis*, *cis*-muconate 로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 암호화하는 것을 알 수 있 었다. 이 유전자 군은 영국에서 분리된 Pseudomonas putida NCIMB 9866과 9869의 plasmid에서 유래된 pch 유전자 군과 동일하여, 이들 유전자군은 종간 horizontal gene transfer로 전 달되었을 가능성을 제시하였다. 각 유전자군의 관련 유전자의 변이와 gfp 레포터를 갖는 프로모터의 발현 분석을 통해 3개의 분해 유전자군이 모두 p-cresol의 분해에 관여하는 것을 알 수 있었으며, pch 유전자는 p-cresol에 의해 유도되며, 고체 및 액 체 배지에서도 pcu 유전자군이 가장 높게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 pcu 유전자 변이주는 p-cresol을 이용하여 버섯모양의 공중체(aerial structure) 형성하지 않았으므로, 탄 소원의 이용 속도가 다세포 구조 형성에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나임을 알 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 2015-2016년도 창원대학교 자율연구과제 연구 비 지원으로 수행된 연구결과입니다. 변이주 제작에 참여한 임은진, 조아라양에게 감사드립니다.

References

- Bayly, R.C., Dagley, S., and Gibson, D.T. 1966. The metabolism of cresols by species of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 101, 293–301.
- Chang, M.C., Chang, H.H., Chan, C.P., Yeung, S.Y., Hsien, H.C., Lin, B.R., Yeh, C.Y., Tseng, W.Y., Tseng, S.K., and Jeng, J.H. 2014. p-Cresol affects reactive oxygen species generation, cell cycle arrest, cytotoxicity and inflammation/atherosclerosis-related modulators production in endothelial cells and mononuclear cells. *PLoS One* 9, e114446.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141–1156.
- Chen, Y.F., Chao, H., and Zhou, N.Y. 2014. The catabolism of 2,4-xylenol and *p*-cresol share the enzymes for the oxidation of para-methyl group in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1349–1356.

Cho, J.H., Jung, D.K., Lee, K., and Rhee, S. 2009. Crystal structure and

functional analysis of the extradiol dioxygenase LapB from a long-chain alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34321–34330.

- Cho, A.R., Lim, E.J., Veeranagouda, Y., and Lee, K. 2011. Identification of a *p*-cresol degradation pathway by a GFP-based transposon in *Pseudomonas* and its dominant expression in colonies. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1179–1183.
- Cunane, L.M., Chen, Z.W., Shamala, N., Mathews, F.S., Cronin, C.N., and McIntire, W.S. 2000. Structures of the flavocytochrome *p*-cresol methylhydroxylase and its enzyme-substrate complex: gated substrate entry and proton relays support the proposed catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 295, 357–374.
- Dagley, S. and Patel, M.D. 1957. Oxidation of *p*-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 66, 227–233.
- Dennis, J.J. and Zylstra, G.J. 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gramnegative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2710 –2715.
- Jeong, J.J., Kim, J.H., Kim, C.K., Hwang, I., and Lee, K. 2003. 3- and 4-alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain KL28: genetic organization of the *lap* gene cluster and substrate specificities of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase. *Microbiology* 149, 3265–3277.
- Joesaar, M., Heinaru, E., Viggor, S., Vedler, E., and Heinaru, A. 2010. Diversity of the transcriptional regulation of the *pch* gene cluster in two indigenous *p*-cresol-degradative strains of *Pseudomonas fluorescens. FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 464–475.
- Kim, J., Fuller, J.H., Cecchini, G., and McIntire, W.S. 1994. Cloning, sequencing, and expression of the structural genes for the cytochrome and flavoprotein subunits of *p*-cresol methylhydroxylase from two strains of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 176, 6349– 6361.
- Kim, J.Y., Kim, J.K., Lee, S.O., Kim, C.K., and Lee, K. 2005. Multicomponent phenol hydroxylase-catalysed formation of hydroxyindoles and dyestuffs from indole and its derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 163–168.
- Kukor, J.J. and Olsen, R.H. 1992. Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol/cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and functional analysis of the encoded enzyme. J. Bacteriol. 174, 6518–6526.
- Lee, K. 2013. Construction of overexpression vectors and purification of the oxygenase component of alkylphenol hydroxylase of *Pseudomonas alkylphenolia. Korean J. Microbiol.* 49, 95–98.
- Lee, K., Lim, E.J., Kim, K.S., Huang, S.L., Veeranagouda, Y., and Rehm, B.H. 2014. An alginate-like exopolysaccharide biosynthesis gene cluster involved in biofilm aerial structure formation by *Pseudomonas alkylphenolia. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4137–4148.
- Lee, K. and Veeranagouda, Y. 2009. Ultramicrocells form by reductive division in macroscopic *Pseudomonas* aerial structures. *Environ. Microbiol.* 11, 1117–1125.

- Li, D., Yan, Y., Ping, S., Chen, M., Zhang, W., Li, L., Lin, W., Geng, L., Liu, W., Lu, W., and Lin, M. 2010. Genome-wide investigation and functional characterization of the beta-ketoadipate pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Microbiol.* **10**, 36.
- Miller, W.G., Leveau, J.H., and Lindow, S.E. 2000. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 1243–1250.
- Mulet, M., Sanchez, D., Lalucat, J., Lee, K., and Garcia-Valdes, E. 2015. *Pseudomonas alkylphenolica* sp. nov., a bacterial species able to form special aerial structures when grown on *p*-cresol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4013–4018.
- Naessens, M. and Vandamme, E.J. 2003. Multiple forms of microbial enzymes. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1119–1124.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum. Gene* 145, 69–73.
- Shingler, V., Powlowski, J., and Marklund, U. 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**, 711–724.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxomonic study. J. Gen. Microbiol. 43, 159– 271.
- Veeranagouda, Y., Basavaraja, C., Bae, H.S., Liu, K.H., and Lee, K. 2011. Augmented production of poly-β-D-mannuronate and its acetylated forms by *Pseudomonas*. *Process Biochem.* 46, 328– 334.
- Veeranagouda, Y., Lee, K., Cho, A.R., Cho, K., Anderson, E.M., and Lam, J.S. 2011. Ssg, a putative glycosyltransferase, functions in lipo- and exopolysaccharide biosynthesis and cell surface-related properties in *Pseudomonas alkylphenolia*. *FEMS Microbiol*. *Lett.* 315, 38–45.
- Veeranagouda, Y., Lim, E.J., Kim, D.W., Kim, J.K., Cho, K., Heipieper, H.J., and Lee, K. 2009. Formation of specialized aerial architectures by *Rhodococcus* during utilization of vaporized *p*-cresol. *Microbiology* 155, 3788–3796.
- Wright, A. and Olsen, R.H. 1994. Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 235–242.
- Yan, Z., Wei, X., Yuan, Y., Li, Z., Li, D., Liu, X., and Gao, L. 2016. Deodorization of pig manure using lignin peroxidase with different electron acceptors. J. Air Waste Manag. Assoc. 66, 420–428.
- Yun, J.I., Cho, K.M., Kim, J.K., Lee, S.O., Cho, K., and Lee, K. 2007. Mutation of *rpoS* enhances *Pseudomonas* sp. KL28 growth at higher concentrations of *m*-cresol and changes its surface-related phenotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 97–103.