

Pseudomonas sp. DJ-12에서 분리한 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase의 효소학적 특성

성태경 · 남정현 · 김치경*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

Enzymatic Properties of the 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase Purified from *Pseudomonas* sp. DJ-12

Sung, Tae-Kyung, Jung-Hyun Nam and Chi-Kyung Kim*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea
Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — The 2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) dioxygenase, the product of *pcb* gene, was purified from the biphenyl and 4-chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas* sp. DJ-12 by the methods of acetone precipitation, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography, and Sephadex G-150 gel filtration chromatography. The enzyme was estimated to be about 260 kilodaltons in molecular weight and to be consisted of eight subunits. The K_m value of the enzyme was 61 μ M to 2,3-DHBP and the highest activity of the enzyme was observed at pH 8 and 30°C. The 2,3-DHBP dioxygenase showed enzymatic activity to the substrate of catechol, but not to 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, and 4-chlorocatechol.

화학적으로 불활성 특성을 지닌 polychlorinated biphenyl(PCBs)은 냉각제, 윤활제, 농약, 제지과정 등에서 각종 용제로 사용되고 있으나, 동물과 인간에게 오염될 때에는 유독하기 때문에 근래에는 사용이 제한되고 있다. 그러나 이러한 규제에도 불구하고 PCBs는 자연계에 계속 오염되고 있으며 토양과 수생태계에 축적되고 있다.

PCBs로 오염된 지역으로부터 그동안 이들을 분해하는 미생물들이 분리되었고, 4-chlorobiphenyl(4CB) 뿐 아니라 biphenyl에 대한 생분해과정이 부분적으로 밝혀졌다(2, 11). 그 대표적인 물질로서 4-chlorobiphenyl은 *pcbA*와 *pcbB*의 산물인 4-chlorobiphenyl dioxygenase와 dihydrodiol dehydrogenase에 의하여 Fig. 1과 같이 2,3-dihydroxy-4-chloro-biphenyl로 변환된다. 그러나 염소화되지 않은 biphenyl도 *pcbAB*와 같은 기능을 하는 *bphAB*에 의하여 2,3-dihydroxybiphenyl

(2,3-DHBP)로 된다(7). 2,3-DHBP는 *bphC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase에 의해 benzene 환의 1번과 2번 위치에서 *meta*-cleavage 방법으로 개환이 일어나 2-hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA : *meta*-cleavage product)로 변환된다. 이 분해산물은 *bphD* 유전자의 산물인 hydrolase에 의해 benzoate(BA)와 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid로 변환되어 TCA cycle로 들어가 완전히 분해된다.

bphC(또는 *pcbC*)의 산물인 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase(2,3-dihydroxybiphenyl : oxygen 1,2-oxidoreductase)는 *Pseudomonas* sp.(6), *Acinetobacter* sp.(1) 그리고 *Alcaligenes* sp.(3) 등의 균주에서 각각 4-chlorobenzoate, 4,4'-dichlorobiphenyl, 4-chlorobiphenyl과 같은 PCBs를 동일한 기작으로 분해한다는 것이 보고되었다. 이 효소는 모두 extradiol-type dioxygenase이며, 2,3-DHBP에 산소원자 2개를 삽입시켜 2-hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoic acid로 변환시키는, 즉 biphenyl의 한쪽 ring 구조의 개환작업을 촉매하는 특성을 가지고 있다.

Key words: 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase, *Pseudomonas* sp. DJ-12

*Corresponding author

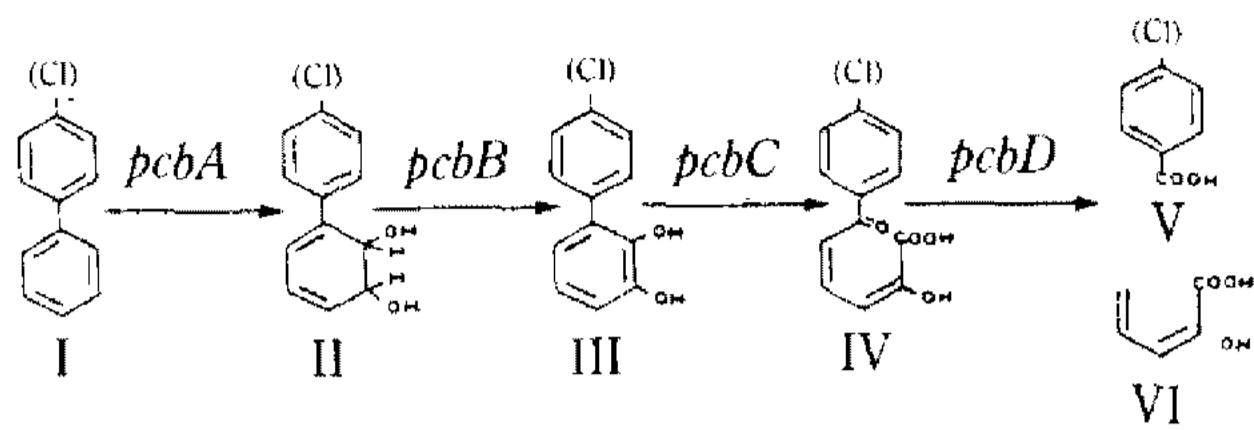


Fig. 1. Catabolic pathway for degradation of 4-chlorobiphenyl or biphenyl.

Compounds; I, 4-chlorobiphenyl; II, 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; III, 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; IV, 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl) hexa-2,4-dienoic acid(meta-cleavage compound); V, 4-chlorobenzoic acid; VI, 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid.

Enzymes; *pcbA*, 4-chlorobiphenyl dioxygenase; *pcbB*, dihydrodiol dehydrogenase; *pcbC*, 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl dioxygenase; *pcbD*, meta-cleavage compound hydrolase.

이와같은 benzene의 개환작용은 위에서 언급한 바와 같이 난분해성 방향족 탄화수소의 오염물질을 분해할 수 있는 열쇠 기능이기 때문에, 2,3-DHBP dioxygenase는 환경 생태학적으로 또 보건화학적으로 매우 중요한 효소이다. 이 과정에 관여하는 효소중, 특히 *bphC*(또는 *pcbC*) 유전자의 산물인 dioxygenase는 benzene 고리의 개환에 의하여 황색의 meta-cleavage product(MCP)를 생성하는 특성 때문에, *bphC*(또는 *cbpC*) 유전자의 클로닝 연구는 이미 보고되었다(8, 10). 본 연구실에서도 PCBs를 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 biphenyl(BP) 및 4CB의 분해효소를 암호화하는 *pcbABCD* 유전자를 클로닝하였다(9, 17).

그러므로 본연구에서는 4-chlorobiphenyl과 biphenyl을 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12의 분해 특성을 자세히 밝히고 또 보다 효율적인 분해균주를 생물공학적으로 개발하기 위하여, 우선 *pcbC* 유전자에 의하여 생성되는 2,3-DHBP dioxygenase를 순수분리하여 효소학적 특성을 밝혔다.

재료 및 방법

실험균주 및 배양

본 실험에서는 BP 및 4CB의 분해균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12(13)와 그로부터 클로닝한 *E. coli* CU103 균주(9)로부터 *pcbC* 유전자의 산물인 2,3-DHBP dioxygenase 효소를 분리 정제하였다. 이 균주들은 Kiyohara 등(14)의 방법으로 MM2 최소배지에 4CB

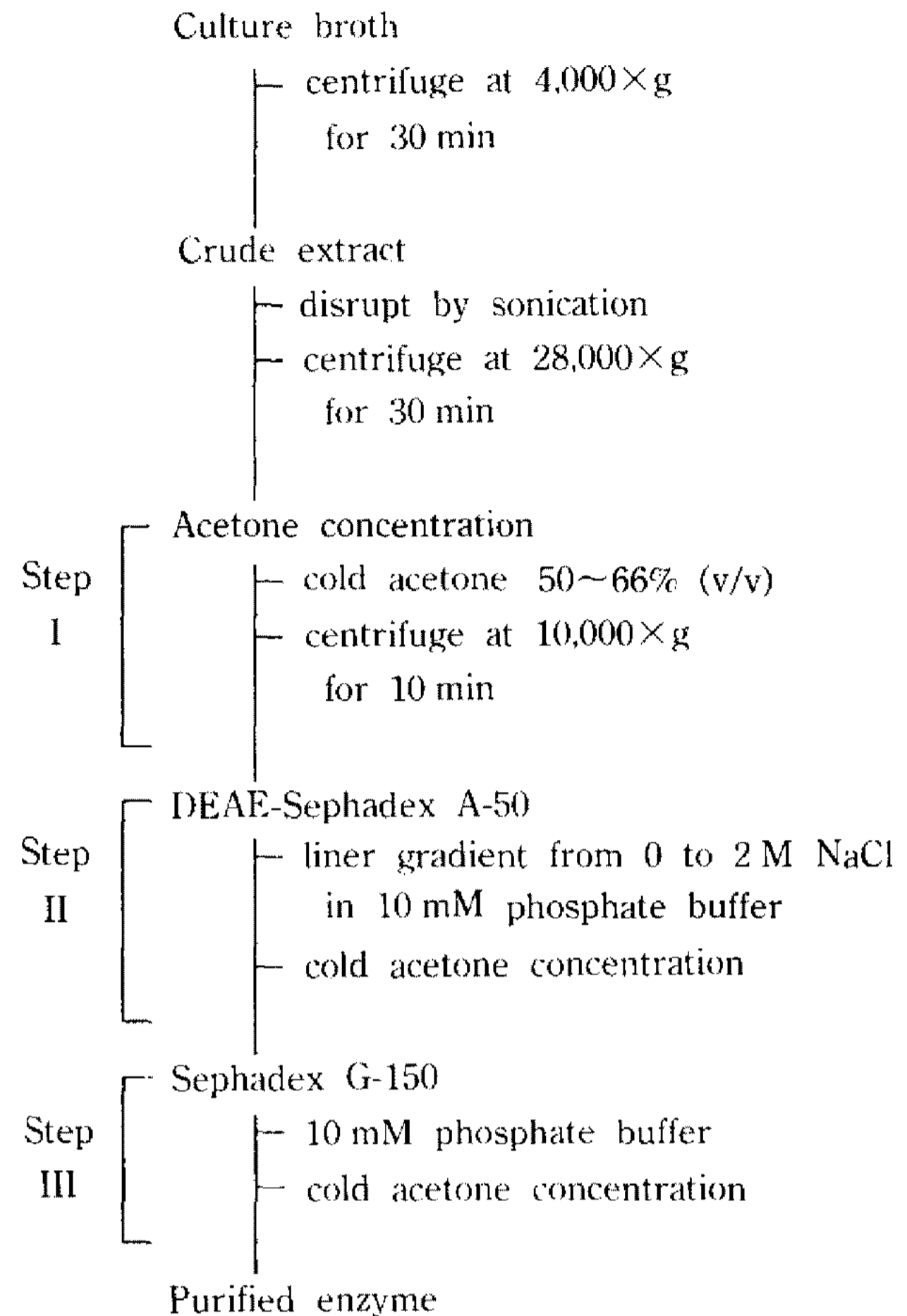


Fig. 2. Purification flow of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase.

또는 BP를 단일탄소원으로 첨가하여 배양하였다. 완전배지로는 Luria-Bertani(LB) 배지(Bacto tryptone, 10 g/l; Bacto yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l, pH 7.0)를 사용하였고, 고체배지의 경우에는 한천을 1.5%로 첨가하였다.

조효소액의 제조

Pseudomonas sp. DJ-12 또는 *E. coli* CU103을 LB broth에서 18시간 배양한 후 배양액을 4,000×g에서 원심분리하여 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척하고 동일 buffer로 현탁하였다. 초음파 파쇄기(Fisher M-300, Pittsburg, USA)로 세포를 파쇄하고 28,000×g에서 30분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다(4).

효소의 분리 및 정제

위에서와 같이 준비한 조효소액을 Fig. 2의 step I에서와 같이 Bollag와 Edelstein(4)의 단백질용액의 농축방법에 따라 40~66% 냉각 acetone으로 농축한

후 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 취하였다. 이 침전물을 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 녹인 후 다시 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 변성된 단백질을 제거하였다. 위의 과정에서 얻은 효소액을 step II에서와 같이 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange column(4.5×50 cm)에 loading하여 단백질을 흡착시켰다. 동일 buffer로 충분히 씻어낸 후 0~2 M NaCl로 linear gradient elution을 하여 흡착된 단백질을 20 ml/hr로 용출시켜 10 ml씩 분획하였다. 앞의 과정에서 얻은 농축된 효소 용액을 step III에서와 같이 Sephadex G-150 gel filtration column(2×120 cm)에서 10 ml/hr로 여과시켜 5 ml씩 분획하였다. 효소활성을 가진 분획을 모아 다시 아세톤 침전법으로 농축하였다.

효소의 활성 측정

2,3-dihydroxybiphenyl(2,3-DHBP) dioxygenase의 활성은 1 mM의 2,3-DHBP를 25°C에서 반응시킨 후 생성되는 *meta*-cleavage product(MCP)의 양으로 측정하였다. 2,3-DHBP dioxygenase의 1 unit은 1분당 1 μM의 MCP를 생성할 수 있는 효소의 양으로 결정하였다(12). 단백질의 정량은 Lowry 등(16)의 방법으로 실시하였고, 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA, Sigma Kit No. P 5656)을 사용하였다.

분자량 측정

효소의 분자량은 Laemmli(15)의 방법에 준하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 측정하였는데, 표준단백질로는 β-galactosidase(116 kD), phosphorylase b(97 kD), albumin, bovine plasma(66 kD), albumin, egg(Ovalbumin, 45 kD), carbonic anhydrase(29 kD)를 사용하였다.

전기영동 및 activity staining

순수분리한 효소는 12% acrylamide를 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동을 한 후 0.05%의 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였고 30%의 methanol과 10%의 acetic acid로 탈색하였다. Native-polyacrylamide gel electrophoresis는 10% acrylamide를 사용하였다. 전기영동을 한 후 Khan과 Walia(10)의 보고에서와 같이 기질인 2,3-DHBP를 분무하여 황색의 *meta*-cleavage product의 생성을 확인하는 방법으로 효소의 activity staining을 하였다.

효소활성의 반응조건

효소활성의 최적 pH를 검토하기 위하여 2,3-DHBP dioxygenase와 1 mM 2,3-DHBP를 아래의 완충용액에 넣고 25°C에서 반응시킨 후 효소의 활성을 비교하였다. pH 6.0~7.5에서는 10 mM phosphate buffer에, 그리고 pH 8.0~10.0에서는 10 mM Tris buffer에 효소를 혼합하여 4°C에서 24시간 방치한 후 효소의 활성을 측정하였다.

10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 1 mM의 2,3-DHBP를 기질로하여 20~80°C의 각 온도에서 효소의 활성을 비교하였다. 효소의 안정성은 각각의 온도에 30분간 방치한 후 활성을 측정하였다. 2,3-DHBP, catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol 등의 기질을 1 mM로 만들어 25°C에서 반응시킨 후 생성된 MCP의 흡광도를 Khan과 Walia(10, 12) 그리고 Chang 등(5)의 방법에 따라 각각 434, 375, 388, 382, 379 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 분리 및 정제

Pseudomonas sp. DJ-12 또는 *E. coli* CU103의 *pcbC*에 의하여 생성되는 2,3-DHBP dioxygenase를 아세톤 침전, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography 방법으로 정제하였다. 아세톤 침전 후

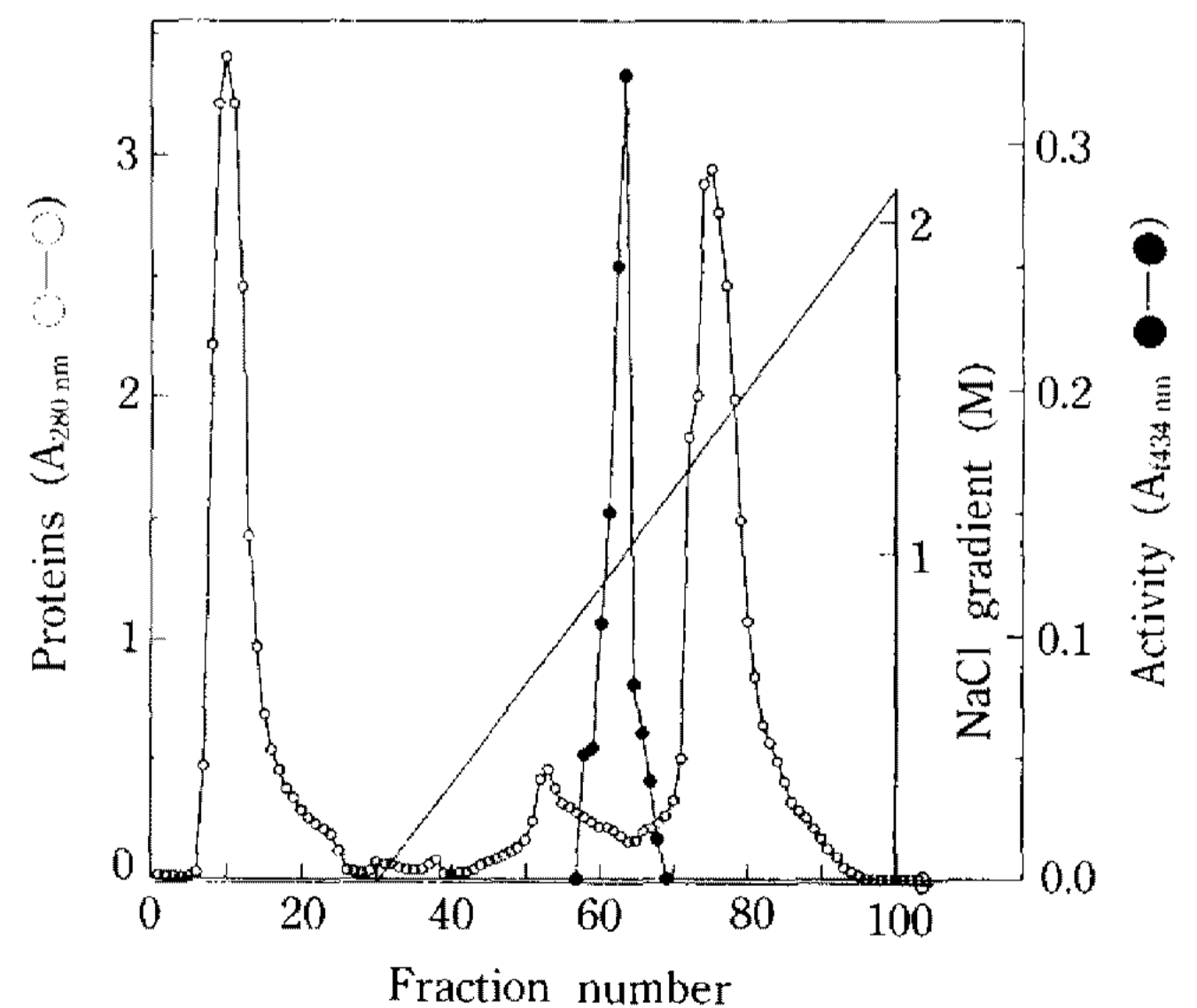


Fig. 3. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatogram of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase.

제 II단계의 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography를 했을 때 Fig. 3에서와 같이 0.5~1 M의 NaCl gradient의 분획에서 효소활성이 나타났다. 제 III단계인 Sephadex G-150 gel filtration chromatography를 하였을 때 30~40번의 분획에서 Fig. 4와 같이 효소활성이 나타났다. 조효소액으로부터 3단계의 분리정제가 끝난 후 2,3-DHBP dioxygenase의 활성은 Table 1에서와 같이 약 30배 증가되었다.

정제효소의 분자량 및 K_m

SDS-PAGE를 이용하여 이 효소의 분자량을 측정한 결과는 Fig. 5와 같이 33 kD의 단백질이 검출되었다. 또 이미 분자량이 알려진 Furukawa와 Miyazaki(7)의 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 균주에서 분리한 단백질과 함께 native-PAGE를 한 후 active staining을 실시한 결과, 본 연구의 2,3-DHBP dioxygenase는 Fig. 6에서와 같이 분자량이 약 260 kD인 KF707 균주의 2,3-DHBP dioxygenase와 같은 위치에서 검정되었으므로 2,3-DHBP dioxygenase는 Furu-

kawa와 Miyazaki(8)가 분리한 2,3-DHBP dioxygenase에서와 같이 8개의 subunit으로 구성된 octamer로 추정된다.

2,3-DHBP dioxygenase의 기질인 2,3-DHBP를 0.1~5 μ M의 농도에서 효소활성을 측정한 결과 전형적인 Michaelis-Menten 포화곡선을 얻었으며, Fig. 7에서와 같이 Lineweaver-Burk plot에 의하여 계산한 K_m 값은 61 μ M이었다. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707(8)에서 분리한 dioxygenase의 K_m 값은 87 μ M이었으나 *Pseudomonas putida* OU83(10)에서 분리한 dioxygenase의 K_m 값은 14 μ M로 큰 차이가 있었다.

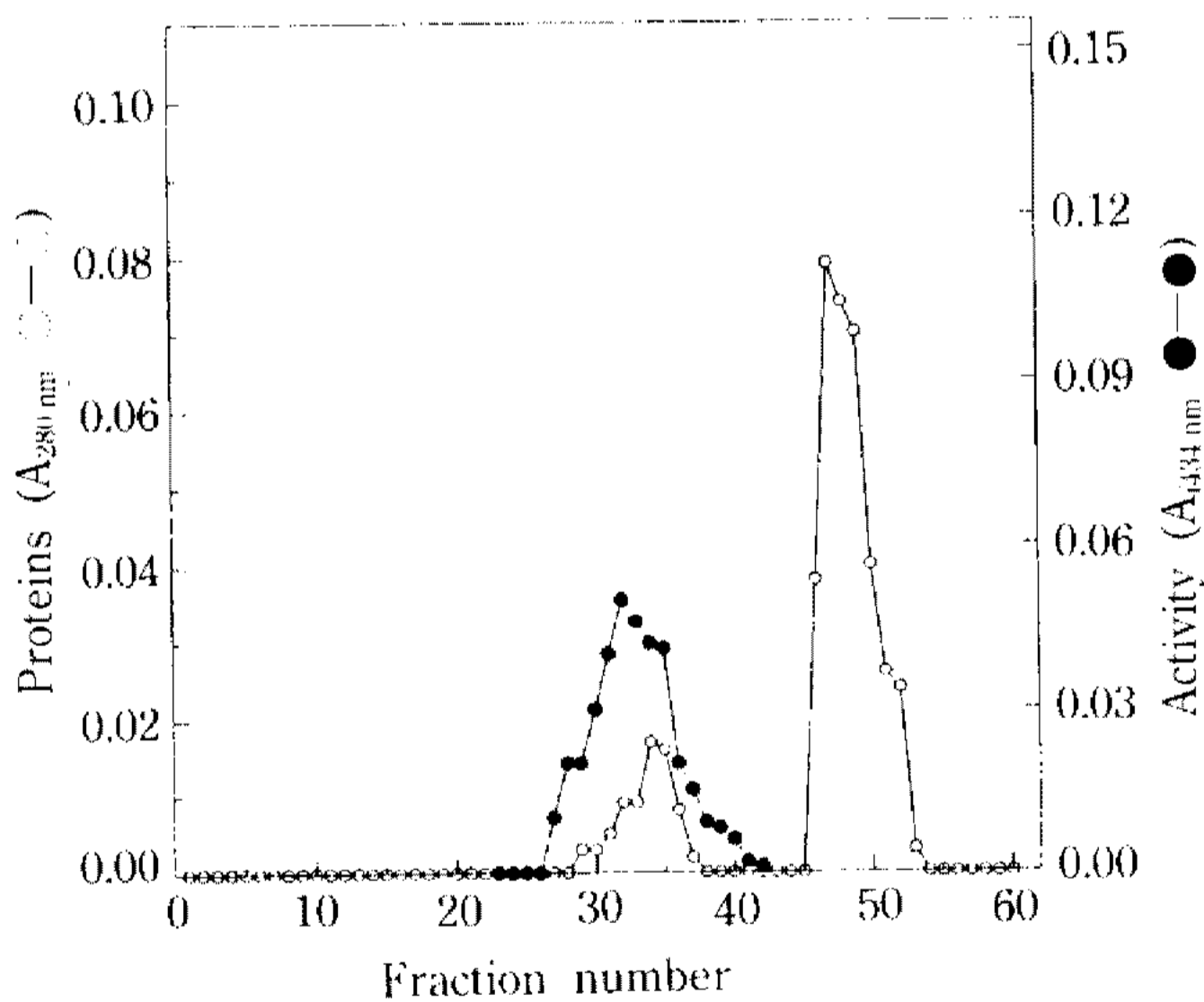


Fig. 4. Sephadex G-150 gel filtration chromatogram of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase.

I II

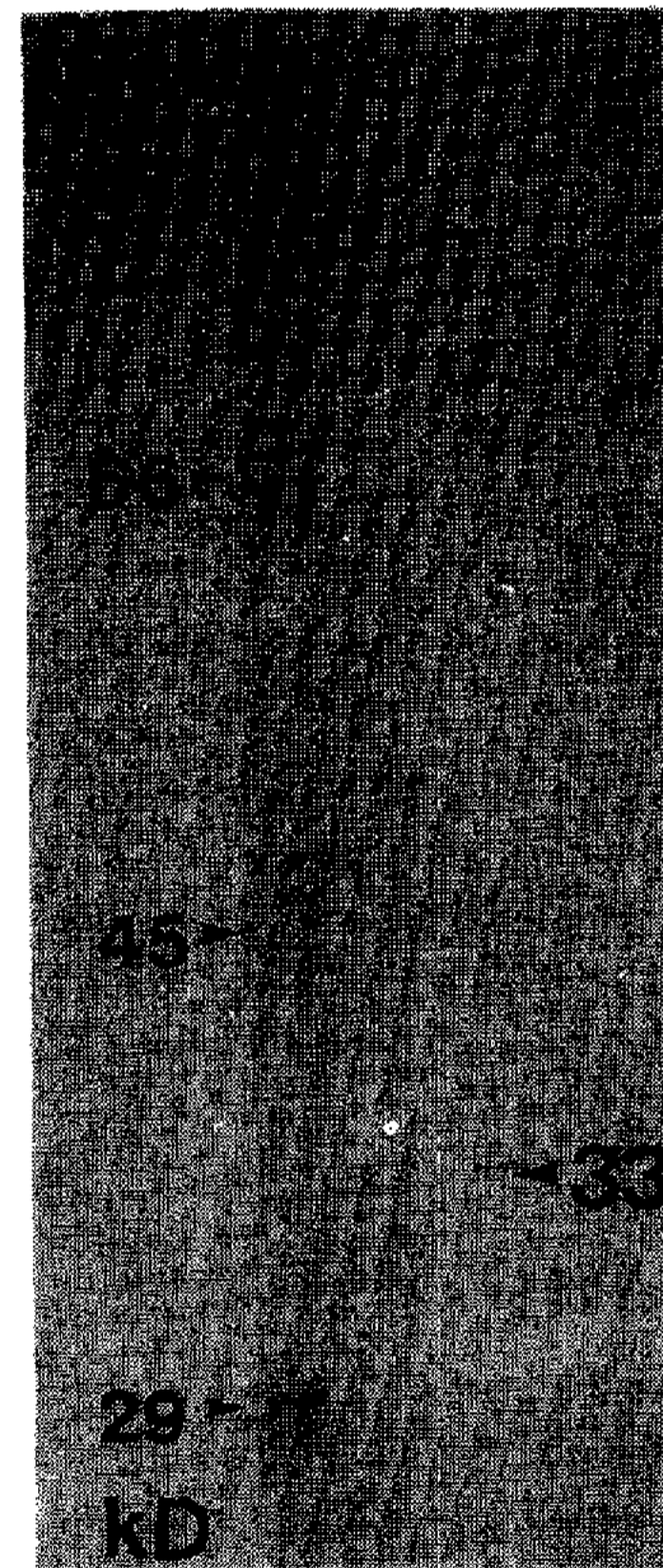


Fig. 5. SDS-PAGE of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase.

Lane I, size marker; Lane II; purified 2,3-DHBP dioxygenase.

Table 1. Purification of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	11,835	7,890	1.5	1	100
(Step I) Acetone precipitation	8,437	2,250	3.75	2.5	71.3
(Step II) DEAE-Seph. A-50	3,344	209	16	10.6	28.3
(Step III) Sephadex G-150	1,768	59	30	20	14.9

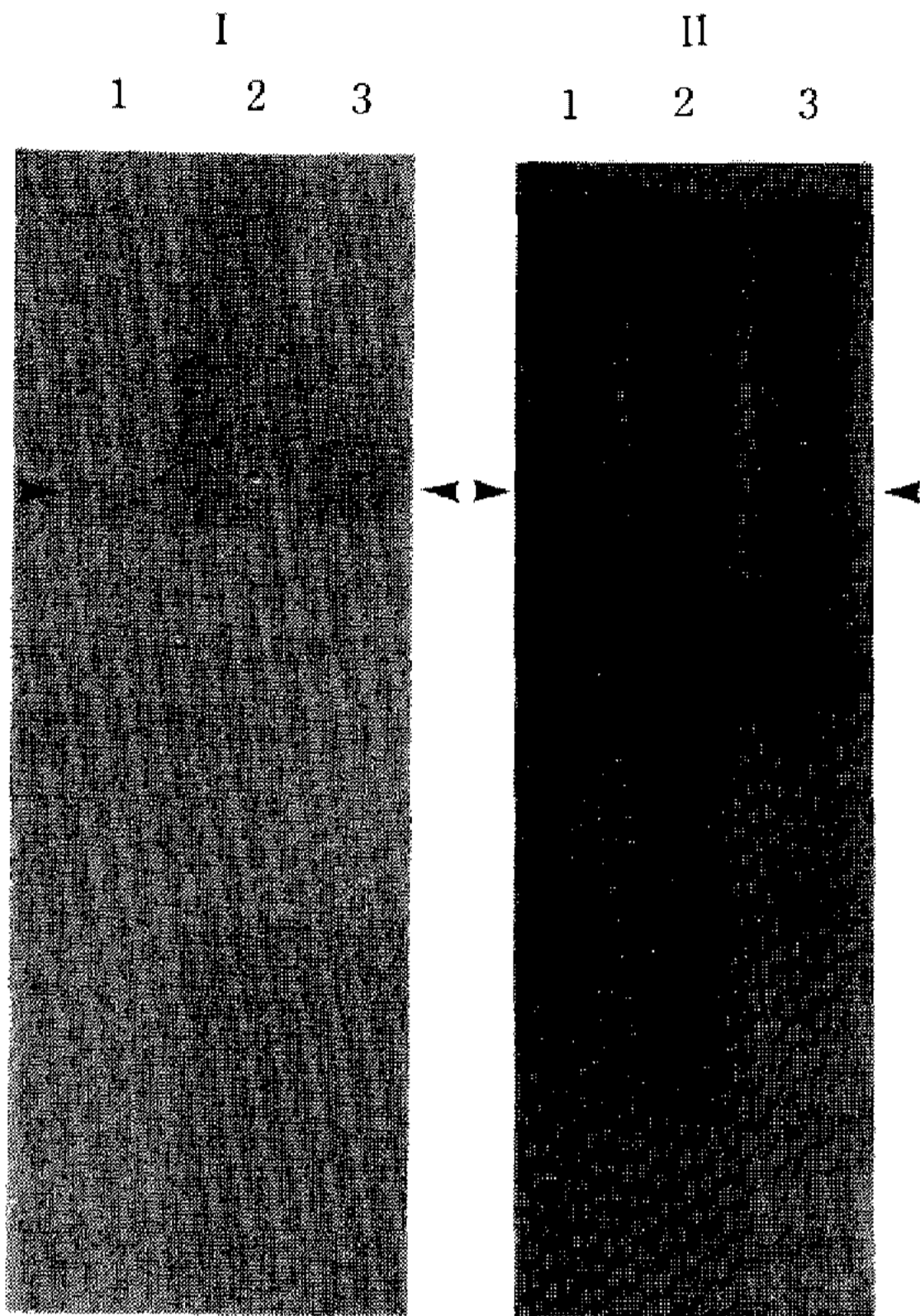


Fig. 6. Native-PAGE of 2,3-DHBP dioxygenase.
 (I) Electrophoresed gel treated with 0.1% solution of 2,3-dihydroxybiphenyl in 50 mM Tris hydrochloride-10 % acetone buffer, pH 7.5. (II) Coomassie blue-stained gel corresponding to phanel I. Lane 1, crude extract of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707; Lane 2, crude extract of *Pseudomonas* sp. DJ-12; Lane 3, crude extract of *E. coli* CU103. The arrows indicate the position of the protein bands showing 2,3-DHBP dioxygenase activity.

효소의 반응특성

2,3-DHBP dioxygenase의 활성에 대한 pH의 영향을 조사한 결과, pH 8.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 8). 한편, 효소액을 동일한 완충용액에서 4°C에서 24시간 방치한 후 잔존 활성을 측정한 결과, Fig. 8에서와 같이 pH 6.0~8.0의 범위에서는 안정성을 나타내었다. Furukawa와 Miyazaki(8)가 분리한 2,3-DHBP dioxygenase는 pH 9에서 최고 활성을 보여주었다.

10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 1 mM의 2,3-DHBP를 기질로 하여 효소의 활성을 측정한 결과, Fig. 9에서와 같이 10~70°C에서 높은 효소활성을 나타내었다. 이 효소를 20~90°C까지의 온도에서 30분간 방치한 후 잔존 활성을 측정한 결과는 Fig. 10에서와 같이 20~30°C에서 안정하였으며, 50°C 이상의 온도에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다.

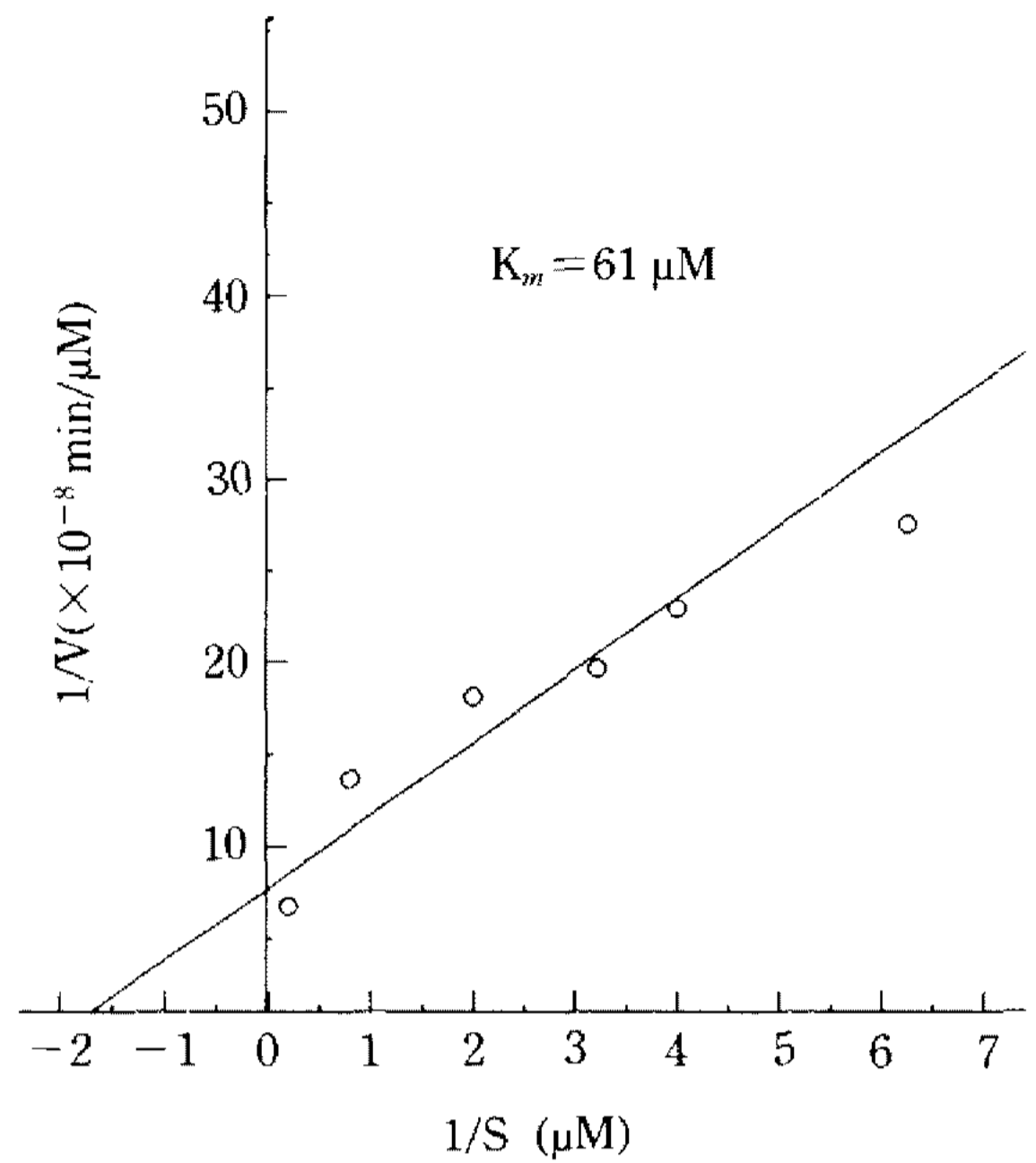


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase to 2,3-DHBP.

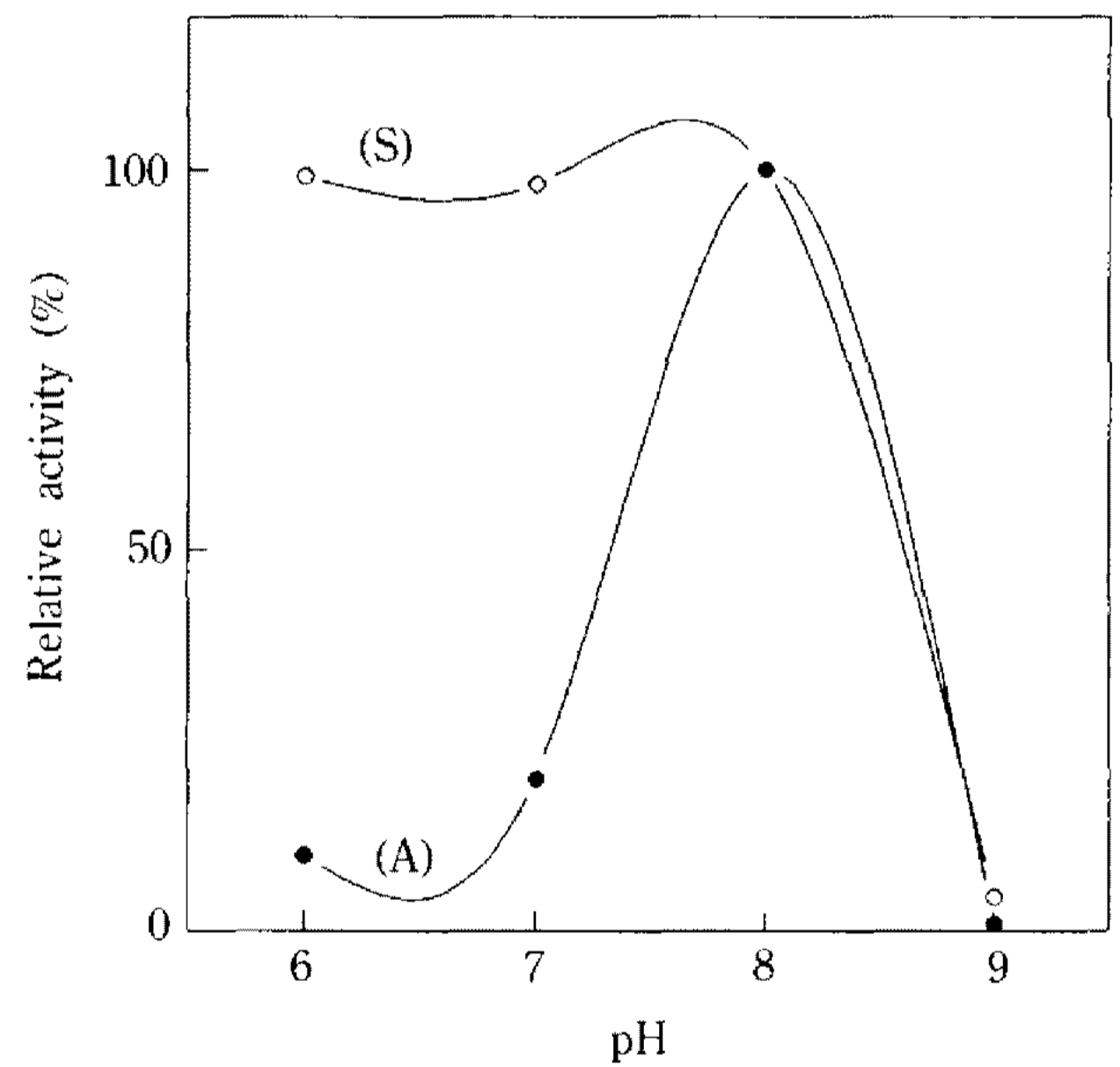


Fig. 8. Effect of pH on the activity (A) and stability (S) of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase.

2,3-DHBP, catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol 등을 기질로 하여 효소의 활성도를 측정한 결과, 2,3-DHBP에 대한 활성을 100으로 했을때 catechol에 대한 활성은 table 2에서와 같이 45%로 나타났다. 그러나 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol에 대한 활성은 매우 미미하였다. 이러한 결과는 2,3-DHBP에만 기질특이성을 나타내는 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (8)의 2,3-DHBP dioxygenase와, 그리고 Chang 등(5)

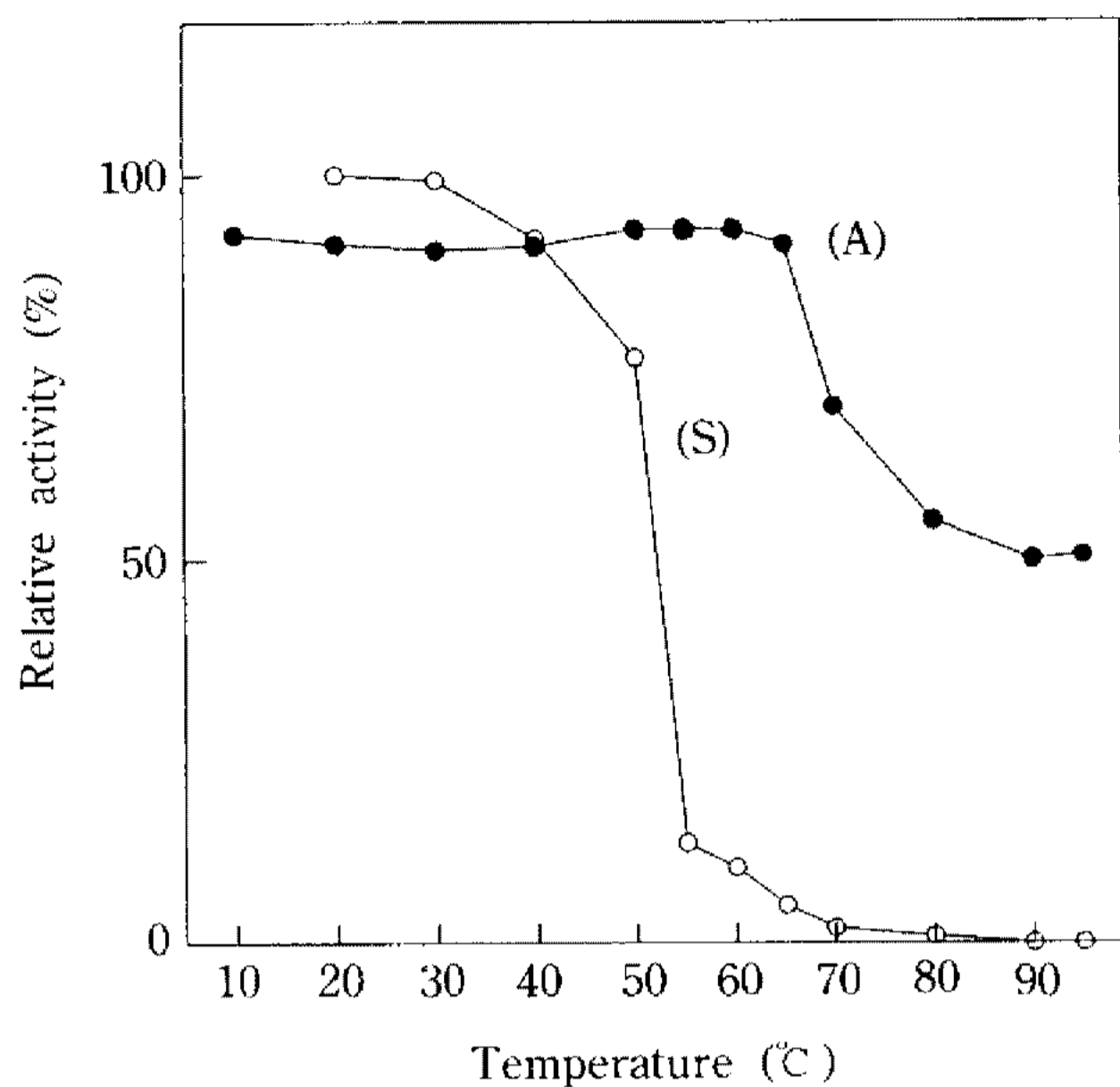


Fig. 9. Effect of temperature on the activity (A) and stability (S) of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase.

Table 2. Substrate profile of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase

Substrate	2,3-DHBP dioxygenase activity (U/mg of protein) ^a	Relative activity (%)
2,3-DHBP	23	100
Catechol	10.36	45
3-methylcatechol	1.65	7
4-methylcatechol	0.1	0.4
4-chlorocatechol	0.1	0.4

^aOne unit of enzyme activity is equal to the formation of 1 μ M *meta*-cleavage product from 2,3-DHBP per minute at 25°C.

이 pCNU201과 pCNU501로부터 분리한 catechol 2,3-dioxygenase의 기질특이성과 매우 유사하였다. 그러나 catechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 그리고 2,3-DHBP에 대하여 넓은 기질특이성을 나타내는 *Pseudomonas putida* OU83(10)의 2,3-DHBP dioxygenase와는 상이하였다.

요 약

Pseudomonas sp. DJ-12로부터 2,3-DHBP dioxygenase를 아세톤 침전, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography 방법으로 분리정제하였다. 이 효소의 분자량은 약 260 kD였으며, SDS-PAGE를 수

행한 결과 33 kD의 subunit 8개로 이루어진 octamer임을 알 수 있었다. 2,3-DHBP에 대한 이 효소의 K_m 값은 약 61 μ M이었다. 이 효소의 최적 활성온도는 20~70°C였으며, 10~50°C의 온도에서 안정하였다. 또한 이 효소의 최적 pH는 8.0이었으며 pH 6.0~8.0에서 안정성을 나타내었다. Catechol에 대한 2,3-DHBP dioxygenase의 활성도는 2,3-DHBP에 비하여 약 45%였으나, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol의 기질에 대해서는 특이성이 거의 없었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터)의 연구과제로 수행되었으며, 한국과학재단의 연구비 지원에 감사드린다.

참고문헌

- Adriens, P., H.-P.E. Kohler, D. Koheler-Stub and D.D. Focht. 1989. Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4,4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 887-892.
- Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi and R. Masse. 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the *meta*-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1375-1385.
- Bedard, D.L., R.E. Wagner, M.J. Brennan, M.L. Haberl and J.F. Brown, Jr. 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1094-1102.
- Bollag, D.M. and S.J. Edelstein. 1991. Protein methods. Wiley-Liss, New York.
- Chang, H.G., J.G. Lee, S.K. Roh, S.R. Kim, K.R. Min, C.K. Kim, E.G. Kim and Y.S. Kim. 1992. Molecular cloning and characterization of catechol 2,3-dioxygenases from biphenyl/polychlorinated biphenyls degrading bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **187**: 609-614.
- Fetzner, S., R. Muller and F. Lingens. 1989. Degradation of 2-chlorobenzoate by *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *J. Biol. Chem.* **370**: 1173-1182.
- Furukawa K. and T. Miyazaki. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcali-*

- genes. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398.
8. Furukawa K. and T. Miyazaki. 1987. Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene. *J. Bacteriol.* **169**: 924-927.
 9. Han, J.J., T.K. Sung and C. K. Kim. 1993. Cloning and expression of *pcbAB* gene coding for degradation of 4-chlorobiphenyl and biphenyl. *Kor. J. Microbiol.* **31**: 129-135.
 10. Khan, A. and S. Walia. 1988. Molecular cloning of 3-phenylcatechol dioxygenase involved in the catabolic pathway of chlorinated biphenyl from *Pseudomonas putida* and its expression in *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2664-2671.
 11. Khan, A. and S. Walia. 1990. Identification and localization of 3-phenylcatechol dioxygenase and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase genes of *Pseudomonas putida* and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 956-962.
 12. Khan, A. and S. Walia. 1991. Expression, localization, and functional analysis of polychlorinated biphenyl degradation genes *cbpABCD* of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1325-1332.
 13. Kim, C.K., J.W. Kim and Y.C. Kim. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**: 122-128.
 14. Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 454-457.
 15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*. **227**: 680-685.
 16. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, N.E. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 17. Yun, D.J., J.J. Han, C.K. Kim and Y. Kim. 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4CB catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 53-59.

(Received March 12, 1993)