

Aniline 분해세균 *Delftia* sp. JK-2에서 분리된 catechol 2,3-dioxygenase의 특성 및 N-말단 아미노산 서열분석

황선영 · 송승열 · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

단일 탄소원과 질소원 및 에너지원으로 aniline을 이용하는 *Delftia* sp. JK-2에서 분리 정제한 catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O)의 특성과 N-말단 아미노산 및 DNA 서열을 분석하였다. C2,3O의 특성을 조사하기 위하여 aniline에서 배양한 *Delftia* sp. JK-2를 초음파 분쇄기로 파쇄하였으며, ammonium sulfate precipitation과 DEAE-sepharose로 정제하였다. 정제된 C2,3O의 고유활성(specific activity)은 약 4.72 unit/mg이었으며, C2,3O는 catechol과 4-methylcatechol에 대해서 효소활성을 나타내었다. C2,3O는 30°C와 pH 8.0에서 최적 활성을 나타내는 것으로 조사되었으며, Ag⁺, Hg⁺, 그리고 Cu²⁺는 *Delftia* sp. JK-2의 C2,3O 활성을 억제하였다. SDS-PAGE에 의해 측정된 C2,3O의 분자량은 약 35 kDa이었으며, N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, 'MGVMRIG-HASLKVMDMDA-AVRHYENV²⁶'로 확인되었다. 이 N-말단 아미노산 서열은 *Pseudomonas* sp. AW-2와 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O와 일치하는 것으로 나타났으며, 얻어진 결과를 토대로 primer를 제작하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. PCR을 통해 얻어진 *Delftia* sp. JK-2의 C2,3O 유전자 DNA 서열을 분석하여 상동성 조사를 하였다. DNA 서열의 상동성 조사는 유추되는 아미노산 서열로 바꾸어서 실시하였으며, 그 결과 *Delftia* JK-2의 C2,3O는 *Pseudomonas* sp. AW-2의 C2,3O(100%)와 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O(97%)에서 높은 상동성이 확인되었다.

Key words □ *Delftia* sp. JK-2, aniline, catechol 2,3-dioxygenase, polymerase chain reaction

Aniline은 제약, 플라스틱, 염색, 살충제 등의 제조에 원료로서 널리 사용되어 왔다(7,14). 또한 폭발물, 아질산 아질린계 제조제, 니트로 피렌(nitropyrene)과 같은 니트로 방향족 화합물의 미생물에 의한 전환으로 생성되며 자연계에 광범위하게 분포하는 합성 화합물로(14), 구조적으로 안정하며 분해가 어려운 난분해성 물질로 독성을 가지는 환경 오염물질로 인식되고 있다(10,15). 장기간의 걸친 사용으로 환경에는 많은 aniline이 축적되고 있는데, 비료나 농약으로 사용됨으로 토양에 잔류되거나 강우나 유실수로 인한 수계오염으로 수계 생물에 악영향을 미치고 있다(9,10). Aniline은 일반적으로 광산화(photooxidation), 증발, 자가산화, 화학 결합에 의해서도 일부가 분해되어 제거되지만 가장 효과적인 제거 방법은 미생물에 의한 생분해 과정을 통한 제거 방법이다(14,16). 수계 환경으로 유입된 aniline의 생분해 경로가 Lyons 등(16)에 의해서 연구되어졌고, 미생물에 의한 aniline 분해는 *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus erythropolis* AN-3, *Delftia* sp. AN3 등에서 연구되었다(1,15,24).

미생물에 의한 aniline 분해는 호기적인 조건에서 aniline이 산화적 탈아미노화 기작을 거쳐 catechol을 형성하고 이렇게 형성된 catechol은 두 가지 다른 경로를 가지게 하는 dioxygenase에 의해 분해되어진다. Catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O)가 catechol

에 작용하여 2 개의 산소원자가 붙게 되면 2-hydroxymuconic semialdehyde를 형성한다. 이 작용에 의해서 방향족 고리가 열리게 되고, 최종적으로 미생물이 직접적으로 이용할 수 있는 pyruvate와 acetaldehyde로 분해되는 것이 보고되고 있다(15). 이들 대사산물은 TCA 회로를 통해 탄소원과 에너지원으로 이용된다. 몇몇 과학자에 의해서 C2,3O의 대한 연구가 *Pseudomonas* sp. AW-2, *Comamonas* sp. JS765, *Rhodococcus rhodochrous* CTM 등 여러 종의 미생물에서 이루어졌다(19,21,22). Aniline에서 배양한 *Pseudomonas* sp. FK-8-2에서 C2,3O를 분리하여 특성 조사를 이루었고(23), 또한 aniline을 분해하는 *Pseudomonas* sp. AW-2로부터 C2,3O를 분리하여 특성조사와 유전자 분석이 연구된 바 있다(19). Milo 등(17)은 *Bacillus thermoleovorans* strain A2에 존재하는 C2,3O가 높은 온도에서도 안정하다는 것을 보고한 바 있다. C2,3O의 연구는 효소학적 연구 외에도 분자유전학적인 연구가 많은 진척을 보여왔다. Schreiner 등(22)은 2-methylaniline을 분해하는 *Rhodococcus rhodochrous* CTM에서 C2,3O 유전자를 클로닝하여 발현시켰고, nitrobenzene을 이용하는 *Comamonas* sp. JS765을 이용하여 C2,3O 유전자 서열 분석하고 클로닝하여 유전자를 발현시킨 연구가 보고된 바 있다(21).

본 연구에서는 도시폐수처리장에서 분리된 aniline 분해세균인 *Delftia* sp. JK-2에 C2,3O를 분리·정제하여, 여러 가지 환경요인에 대한 C2,3O의 활성을 측정하고, 이 효소가 가지는 특성과 억제효과를 조사하였다. 또한 C2,3O의 아미노산과 DNA 서열을

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-1353, Fax: 041-530-1350
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

분석하여 다른 미생물에서 발견되는 C2,3O와의 유사성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 확보 및 배양조건

천안소재 폐수처리장으로부터 수거된 활성 슬러지로부터 aniline을 분해하는 *Delftia* sp. JK-2를 분리·동정하였다. 분리에 사용된 배지는 증류수 1 L당 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 , 0.41 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 g $CaCO_3$ 에 단일 탄소원 및 질소원으로 1 g의 aniline을 포함하는 액체 무기배지를 사용하였으며, 30°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. *Delftia* sp. JK-2에 대한 생리생화학적 특성, 분해에 미치는 부가 탄소원과 부가 질소원의 영향, 그리고 16s rDNA 염기서열의 계통수 분석(phylogenetic tree) 결과는 이미 보고된 바 있다(7).

C2,3O의 분리

배양한 *Delftia* sp. JK-2는 효소 분리를 위해 분광광도계(V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 이용하여 660 nm에서 O.D.값이 1.0일 때 250 ml의 원심분리 튜브에 넣고 4,100 ×g에서 10 분간 원심분리를 실시하였고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 3 번 세척하였다. 준비된 세포는 초음파 파쇄기(Fisher M-300, Pittsburgh, PA, USA)로 30 초간 30 회 반복하여 파쇄하였다. 파쇄한 용액은 원심분리(8,700×g, 30 min, 4°C)하여 상등액을 취하였다. 상등액을 30% 포화 ammonium sulfate를 만들기 위해 천천히 교반하면서, L 당 176 g의 ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 한 시간동안 반응하였다. 6,300×g에서 20 분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 취하였다. 다시 상등액에 L 당 160 g의 ammonium sulfate를 위와 같은 방법으로 첨가하여 55% 포화 ammonium sulfate를 만들어 6,300×g에서 20 분간 원심 분리하여 침전물을 획득하였다. 침전물을 7 ml의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 30 분간 완전히 재현탁 하였다. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹인 침전물을 투석막(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 넣고 1 L의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에서 10 시간 이상 투석 후 새로운 buffer에서 다시 투석을 실시하였다. 투석을 실시한 용액을 DEAE-sepharose 컬럼(2.5×20 cm)에 주입하여 NaCl의 농도를 0.1에서 0.5 M로 증가시키면서 1.25 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 용출액은 C2,3O의 활성이 있는 부분을 모아서 단백질 정량을 실시하고, 다시 DEAE-sepharose 컬럼에 주입하여 같은 방법에 1.0 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 용출액은 분취기로 모아서 효소 활성 측정을 통해 효소를 분리하였고 분리한 용액은 Bradford 방법(4)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다.

SDS-PAGE

컬럼을 통해 분리된 C2,3O는 Bollag 등의 방법(5)을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating gel은 12%의 acrylamide

gel을 사용하였고, stacking gel은 5%의 acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. 시료는 Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시하여 동일량의 단백질을 주입하였고, 1×sample buffer로 양을 맞추었다. 시료를 5 분간 끓이고, 얼음에 식힌 후 주입하였다. 표지 단백질은 prestained SDS-PAGE Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 전기영동은 100 V에서 2 시간 30 분간 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 gel staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2 시간 염색하였고, gel destaining solution I (10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1 시간동안 처리한 후, gel destaining solution II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)으로 8 시간 처리하였다.

C2,3O의 활성 측정

Catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O)의 활성 측정은 2-hydroxymuconic semialdehyde의 생성에 의해 측정되는 Aoki 방법(2)에 의해서 실시되었다. 2 ml의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 10 μl의 100 mM catechol, 그리고 효소의 정제과정을 통하여 분리된 시료를 첨가하여 375 nm에서 측정하였다. 반응 산물인 2-hydroxymuconic semialdehyde의 몰 흡광계수(molar extinction coefficient)는 33,000 M⁻¹cm⁻¹이며, 1 unit를 24°C에서 분당 1 μmole의 2-hydroxymuconic semialdehyde를 생산하는 효소량으로 정하고 고유활성(specific activity)은 unit/mg으로 정하였다.

C2,3O의 특성 조사

기질 특이성을 알아보기 위해서 catechol과 유사한 기질인 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 그리고 4-nitrocatechol을 0.33 mM의 동일한 농도로 첨가하여 실시하였다. 효소 활성의 최적 pH를 조사하기 위하여 50 mM potassium phosphate buffer를 pH 5.0~7.0으로 변화시켜 활성 측정을 하였고, 50 mM Tris base buffer를 이용하여 pH 8.0~12.0에서의 효소 활성을 측정하였다. 온도에 따른 효소 활성 변화의 실험은 25~45°C에서 효소를 catechol과 10분간 반응시키고 0.4 N HCl로 반응을 멈추게 한 후 375 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 억제제에 대한 실험에서는 억제제의 최종농도가 0.1 mM이 되게 첨가한 후에 2분간 효소반응을 실시하였다.

Chromosomal DNA 분리

LB 배지에서 12 시간 동안 배양(30°C, 160 rpm)한 *Delftia* sp. JK-2 30 ml를 원심분리(6,300×g, 10 min, 4°C)하여 세포를 얻었다. 침전된 세포를 5 ml TEN buffer [0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), 0.01 M EDTA, 1M NaCl]로 재현탁하고, lysozyme (20 mg/ml)을 200 μl 첨가하여 37°C에서 15 분간 반응시켰다. 10% SDS를 100 μl 첨가하고, 천천히 섞어주었다. 점도가 높아지면 50 μl proteinase K (20 mg/ml)와 5 μl RNase를 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 5 ml TEN buffer를 더 첨가하고 10 ml의 phenol을 첨가하여 가볍게 섞어주었다. 원심분리를 통하여 상등액을 취하여 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 추출은 2 회,

chloroform 추출은 1회 실시하였다. 상등액을 5 ml 취하여 500 μ l 3 M sodium acetate와 15 ml 첨가하여 원심분리를 실시하였다. 침전된 염색체는 70% ethanol로 염류를 제거하고 다시 원심분리를 하여 공기 중에서 ethanol을 제거하였다. 얻어진 침전물을 300 μ l의 물에 녹인 후 분리 여부를 확인하기 위해서 0.8%의 agarose gel에 전기영동을 실시하였고, UV-spectrophotometer를 이용하여 정량 하였다.

N-말단 아미노산 서열분석

분리한 C2,3O를 SDS-PAGE 상에서 전개하여 전개한 gel을 semidry electroblotter (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 18V, 20 분간 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막(Applied Biosystems, Foster City, USA)에 옮긴 후 PVDF 막을 Coomassie blue R-250 용액으로 염색하였으며, 탈염색을 실시하여 염색된 단백질 부분을 잘라내었다. 잘라낸 PVDF 막을 단백질 자동서열 분석기 Model 491A (Perkin Elmer, Foster City, USA)를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였다. 여기서 얻어진 N-말단 서열은 NCBI의 BLAST Search 프로그램에서 상동성을 분석하였다.

Polymerase chain reaction

N-말단 서열분석 결과를 이용하여 상동성이 높게 나온 *Pseudomonas* sp. AW-2와 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O DNA 서열을 이용하여 primer를 합성하여 PCR (MJ Research, MA, USA)을 실시하였다. Primer No. 1과 No. 2는 coding strand로, 그리고 No. 3와 No. 4는 complementary strand primer로 제작하여, PCR premix kit를 사용하여 증폭하였다. PCR의 운전조건은 시작 denaturation 단계를 94°C에서 5 분간 실시하였고, 94°C에서 30 초, 50°C에서 30 초, 72°C에서 30 초씩 30 cycle을 반응하였으며, 마지막 extension 단계는 72°C에서 5 분간 실시하였다.

DNA sequencing

Agarose gel (0.8%)에 분리된 PCR 산물을 gel extract kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 소개된 방법에 따라 gel로부터 추출하였다. 추출한 PCR 산물을 표지하기 위하여 ABI의 BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (ABI, Piscataway, NJ, USA)를 사용하였다. 2 μ l의 BigDye, 50 ng의 DNA, 2.5 pmole의 primer를 첨가하여 25 cycle (94°C에 30 초, 50°C에 30 초)동안 증폭하여 표지 하였다. DyeEx (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 결합하지 않는 BigDye를 증폭된 DNA로부터 제거하였고, 3700 DNA analyzer (ABI,

Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 서열은 NCBI의 BLAST Search 프로그램을 이용하여 상동성 조사를 실시하였다.

결과 및 고찰

C2,3O의 분리 및 정제

Crude extract 상태인 효소용액의 단백질 양을 30-55%의 ammonium sulfate 침전을 통하여 절반이상으로 줄였으며, 음이온 교환체인 DEAE-sepharose 컬럼을 두 번 실시하여 최종적으로 얻어진 효소는 crude extract에 비하여 10 배 이상 농축된 것으로 나타났다. 최종적으로 분리된 효소는 회수율이 8.6%로 조사되었고, specific activity는 4.72 unit/mg을 나타냈다. Table 1은 각 정제 단계에서 분리해 낸 효소 용액의 단백질 정량과 효소 활성을 보여주고 있다. 각 단계에서 얻은 시료를 SDS-PAGE 상에 전개하여 C2,3O의 정제여부를 확인하였고, 최종적으로 정제된 C2,3O의 분자량이 약 35 kDa임을 관찰하였다(Fig. 1). Gibson 등(21)이 보고한 *Comamonas* sp. JS765에서 분리된 C2,3O는 35 kDa으로 알려졌고, *Alcaligenes* sp. KF711로부터 분리된 C2,3O의 분자량이 35 kDa임을 나타내는 것으로 보고된바 있다(18). 본

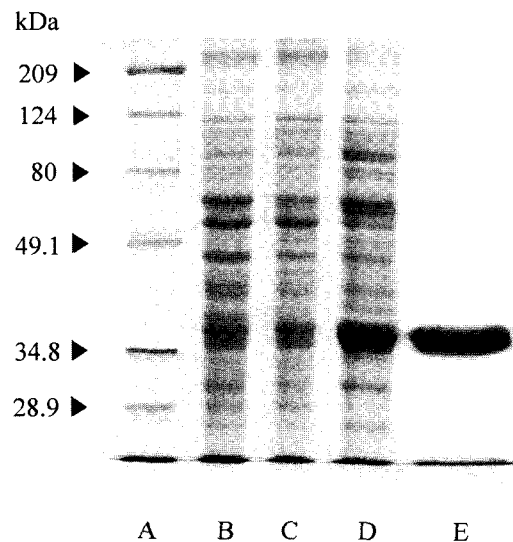


Fig. 1. SDS-PAGE of purified catechol 2,3-dioxygenase. A: marker (myosin-209, β -galactosidase-124, bovine serum albumin-80, ovalbumin-49.1, carbonic anhydrase-34.8, soybean trypsin inhibitor-28.9 kDa), B: crude cell extract, C: 30-50% saturated ammonium sulfate, D: DEAE-sepharose, E: DEAE-sepharose.

Table 1. Purification of catechol 2,3-dioxygenase from *Delftia* sp. JK-2

Purification step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total Activity (U)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification factor
Crude extract	21	100.8	4.4	0.437	100	1
Ammonium sulfate	7	35	40.14	1.147	91.2	2.63
DEAE-Sepharose FF	5	10	29.9	2.99	6.8	6.8
DEAE-Sepharose FF	2	0.8	3.77	4.72	8.6	10.8

Table 2. Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase

Substrate	Relative activity (%)
Catechol	100
3-Methylcatechol	0
4-Methylcatechol	13.8
4-Chlorocatechol	0
4-Nitrocatechol	0

연구에서 분리된 *Delftia* sp. JK-2의 C2,3O는 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O와 97%의 상동성이 있는 것으로 확인되었다.

기질 특이성

분리된 C2,3O의 경우 기질로 catechol (100%)을 이용하였으며, 4-methylcatechol (13.8%)도 이용하는 것으로 관찰되었다. 그러나 catechol의 유사 기질인 3-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 4-nitrocatechol 등은 기질로 이용하지 못하는 것으로 조사되었다. Aniline을 포함하는 액체배지에 배양하여 얻은 C2,3O는 특정 기질에 대해서만 활성을 갖는 것으로 나타났다(Table 2). Cerdan 등(6)은 *Pseudomonas putida*에 존재하는 TOL plasmid와 NAH plasmid에서 각각 발현되는 C2,3O 사이에 나타나는 기질 특이성에 대해 연구하였는데, TOL plasmid에서 발현되는 C2,3O의 경우 catechol, 3-methylcatechol과 4-methylcatechol를 이용하였고, NAH plasmid에서 발현된 C2,3O의 경우는 3-methylcatechol을 이용하지 못하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 분리된 C2,3O는 *Pseudomonas putida*의 NAH plasmid에서 발현된 C2,3O와 기질 이용이 유사한 것으로 나타났다.

pH/온도에 대한 영향

pH와 온도가 C2,3O의 활성에 미치는 영향에 대한 조사에서는 pH 5와 pH 10-12사이에서는 활성이 전혀 나타나지 않았으며, pH 6.0이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 pH 8.0에서 최고의 활성을 나타내었다. 적정온도는 30~35°C이며, 30°C에서 최고의 활성을 나타내었으며, 온도가 27.5°C이하로 떨어지면 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 2). C2,3O가 암호화된 *xylE* 유전자를 *Escherichia coli* W3110에 클로닝하여 대량 발현한 실험에서는 C2,3O 활성의 적정온도가 25°C, 적정 pH가 7.5로 보고되었고(13), phenol 분해 세균인 *Bacillus thermoleovorans* strain A2에서 분리된 C2,3O의 경우 적정온도는 70°C이고, 적정 pH는 7.2로 높은 온도에서 안정한 것으로 알려져 있다(17). 보고된 연구 결과들과 본 실험에서 분리된 C2,3O의 결과를 비교해보면 효소 활성의 최적 pH는 유사하나 최적 온도에 차이를 보이는 것으로 확인되었다.

중금속에 의한 영향

중금속에 의한 C2,3O의 효소 활성 억제에 대한 조사에서 Hg^{2+} , Cu^{2+} 는 C2,3O에 대하여 각각 10.5%, 40.63%로 효소활성이 저해되는 것으로 나타났으며, Ag^{+} 같은 경우는 효소 활성을 완

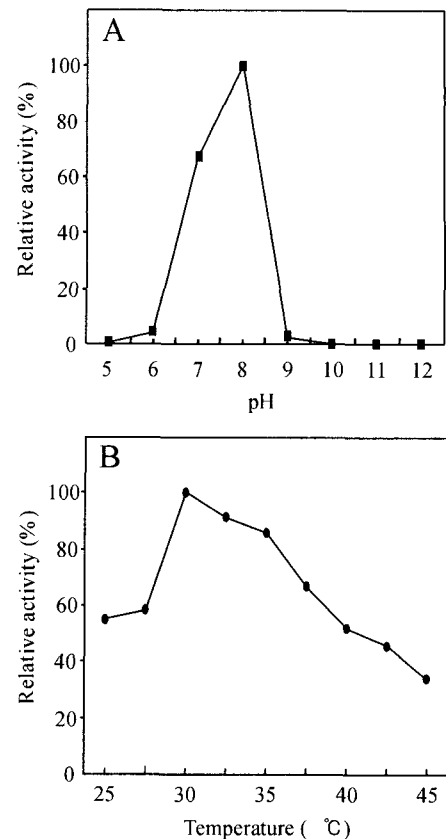


Fig. 2. Effects of pH and temperature on catechol 2,3-dioxygenase activity. (A) Effect of pH on the activity and stability of catechol 2,3-dioxygenase. pH 5-7: 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8-12: 50 mM Tris base buffer. The relative activity was calculated as the activity at pH 8.0 was 100%. (B) Effect of temperature on the activity and stability of catechol 2,3-dioxygenase. The relative activity was calculated as the activity at 30°C was 100%.

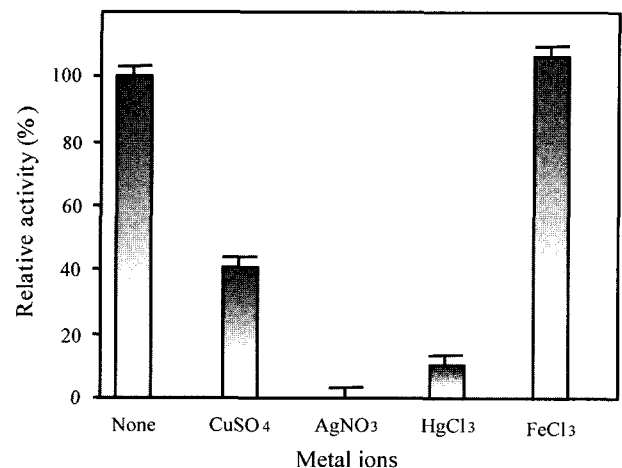


Fig. 3. Effects of various metal ions on the activity of catechol 2,3-dioxygenase. The final concentration of inhibitor was 0.1 mM. Each bar represents the average of three independent experiments.

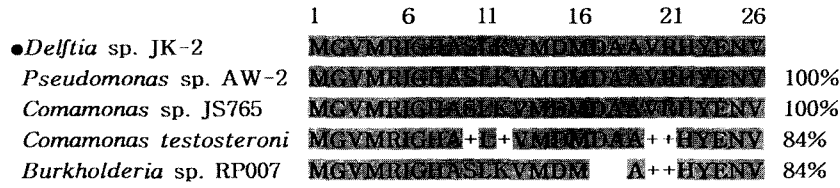


Fig. 4. Sequence alignment of N-terminal sequence of catechol 2,3-dioxygenase of *Delftia* sp. JK-2, with *Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp. JS765, *Comamonas testosteroni* and *Burkholderia* sp. RP007. The catechol 2,3-dioxygenase of *Delftia* sp. JK-2 has 100% identity and 100% similarity with catechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas* sp. AW-2 and *Comamonas* sp. JS765, respectively.

전혀 저해하는 것으로 조사되었다(Fig. 3). 그러나 Fe³⁺의 존재 하에서는 C2,3O의 효소 활성이 증가되었다. 이러한 현상은 C2,3O의 구조 내에 철을 포함하고 있기 때문에 Fe³⁺ 이온이 효소의 활성에 영향을 주지 않거나 효소의 활성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다(5).

N-말단 아미노산 서열분석

분리한 C2,3O를 아미노산 염기 서열 분석기를 통하여 N-말단 으로부터 분석한 아미노산 서열은 'MGVVRIGHASLKV-MDMDAAVRHYENV'²⁶로 나타났다. 분석된 아미노산 서열을 BLAST search 프로그램으로 분석한 결과 *Delftia* sp. JK-2의 C2,3O는 314 개의 아미노산으로 이루어진 *Pseudomonas* sp. AW-2의 C2,3O, *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O와 100%의 상동성이 있는 것으로 나타났으며, *Comamonas testosteroni*와 *Burkholderia* sp. RP007의 C2,3O와는 84%의 상동성이 확인되었다(Fig. 4). *Comamonas* 종에 속하는 균주들의 C2,3O와 높은 상동성이 있는 것으로 보여지고, N-말단에서 분석된 C2,3O의 26 개의 아미노산 서열은 *Pseudomonas* sp. AW-2(19)와 *Comamonas* sp. JS765(21)가 가지는 C2,3O의 N-말단 아미노산 서열 과 일치하는 것으로 나타났다.

C2,3O의 유전자 PCR과 DNA sequencing

Table 3에서 보여준 primer를 이용하여 *Delftia* sp. JK-2의 염 색체 DNA를 PCR한 결과 No. 1과 No. 3 primer로 증폭된 470 bp, No. 1과 No. 4 primer로 증폭된 950 bp, 그리고 No. 2와 No. 4 primer를 이용해서는 490 bp 절편이 증폭되었다(Fig. 5). 증폭된 결과는 *Comamonas* sp. JS765에서 분리된 C2,3O의 DNA 서열로부터 예상되는 절편의 크기가 일치하는 것으로 보여 진다(21). PCR로 증폭된 C2,3O의 DNA 서열을 분석하여 다른 세균의 C2,3O와 상동성을 조사하기 위해 No. 1과 No. 4 primer 를 사용하여 증폭된 PCR 반응산물을 자동염기서열 분석기로 분석하였고, 분석 결과로 890 bp의 정확한 염기서열을 얻었다. 분

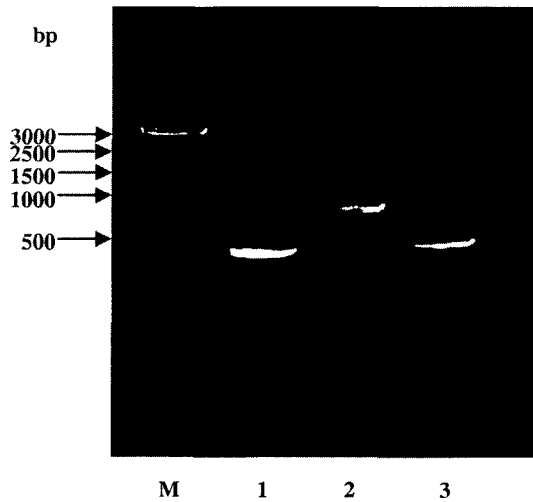


Fig. 5. PCR products of catechol 2,3-dioxygenase gene from *Delftia* sp. JK-2. Lane M, 1 kb DNA ladder; lane 1, PCR product of No. 1 and No. 3 primers (470 bp); lane 2, PCR product of No. 1 and No. 4 primers (950 bp); lane 3, PCR product of No. 2 and No. 4 primers (490 bp).

석된 염기서열은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 상동성 조사를 실시하였다. JK-2의 C2,3O는 *Pseudomonas* sp. AW-2 (100%), *Comamonas* sp. JS765 (97%), *Pseudomonas putida* (84%), *Comamonas testosteroni* (82%), *Pseudomonas cepacia* (77%), *Alcaligenes eutrophus* (36%)과 *Ralstonia* sp. KN1 (35%)의 C2,3O와 상동성이 조사되었다. *Pseudomonas* 종과 *Comamonas* 종에 속하는 세균의 C2,3O와 높은 상동성을 보이는 것으로 확인되었다. N-말단 서열에서 상동성을 나타낸 *Pseudomonas* sp. AW-2는 염기 서열에서도 높은 유사성을 보였다(19). PCR을 통해 얻은 절편은 cloning을 통한 심도 깊은 C2,3O의 연구에 이용될 것으로 사료된다.

본 실험에서는 폐수처리장에서 분리·동정된 aniline 분해세균 인 *Delftia* sp. JK-2에서 생산된 C2,3O를 분리 정제하였다. 분리

Table 3. Design of oligonucleotide for PCR

Designation	Nucleotide sequence	Amino acid sequence	Position
No. 1	ATGGGTGTGATGCGCATCGG	MGVVRIG	N-terminal sequence
No. 2	ATGTGCGAGATGAATCCCCA	CMLLCHD	Internal sequence
No. 3	GCACATCAGCAGGCAGTGGT	MCEMNPE	Internal sequence
No. 4	TCACGTGTACACCTCGGTGA	TYVETFS	C-terminal sequence

정제된 C2,3O는 기질 특이성 및 pH, 온도, 증류속도에 의한 영향 등의 실험으로 물리화학적 특성을 규명하였고, 정제 여부는 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며 분리된 C2,3O의 크기는 약 35 kDa으로 관찰되었다. 본 연구에서 수행된 C2,3O의 N-말단 서열 분석을 통해 다른 균의 C2,3O와의 유사성을 조사하였으며, *Pseudomonas* sp. AW-2와 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O가 본 실험에서 분리된 C2,3O와 상동성이 높은 것으로 확인되었다. N-말단 서열 분석의 결과에서 높은 상동성이 나타난 *Pseudomonas* sp. AW-2와 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O DNA 서열을 이용하여 primer를 제작하였고, C2,3O의 유전자의 PCR를 실시하였다. PCR를 통해 얻어진 절편으로 DNA 서열 분석을 하였으며, DNA 서열 분석 결과 N-말단 서열 분석에도 높은 상동성을 보인 *Pseudomonas* sp. AW-2와 *Comamonas* sp. JS765에서 높은 상동성을 나타냈다(19,21). 향후 본 연구는 얻어진 결과를 바탕으로 cloning 기법을 통한 *Delftia* sp. JK-2 생산하는 C2,3O의 유전자 구조분석 실험으로 진행될 것이다.

참고문헌

- Aoki, K., R. Shinke, and H. Nishira. 1983. Metabolism of aniline by *Rhodococcus erythropolis* AN-3. *Agric. Biol. Chem.* 47, 1611-1616.
- Aoki, K., Y. Nakanishi, S. Murakami, and R. Shinke. 1990. Microbial metabolism of aniline through a meta-cleavage pathway: Isolation of strains and production of catechol 2,3-dioxygenase. *Agric. Biol. Chem.* 54, 205-206.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Gel electrophoresis under denaturing condition. *New York, NY, USA.* 2nd ed., 107-172.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broderick, J.B. 1999. Catechol dioxygenases. *London, WIB IQW, UK.* volume 34, 173-189.
- Cerdan P, M. Rekik, and S. Harayama. 1995. Substrate specificity differences between two catechol 2,3-dioxygenases encoded by the TOL and NAH plasmids from *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.* 229, 113-118.
- Cho, Y.S., H.Y. Kahng, H.W. Chang, and K.H. Oh. 2000. Characterization of aniline-degrading bacterium, *Delftia* sp. JK-2 isolated from activated sludge of municipal sewage treatment plant. *Kor. J. Microbiol.* 36, 79-83.
- Fukumori, F., and C.P. Saint. 1997. Nucleotide sequence and regulatory analysis genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1). *J. Bacteriol.* 170, 399-408.
- Hagblom, M.M. 1992. Microbial breakdown of halo-genated aromatic pesticides and related compound. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 29-72.
- Hermans, J.L., S.P. Bradbury, and S.J. Broderius. 1991. Influence of cytochrome P450 mixed function oxidase induction on the acute toxicity to rainbow trout of aromatic amines. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 20, 156-166.
- Kaschabek, S.R., T. Kasberg, D. Miller, A.E. Mars, D.B. Janssen, and W. Reineke. 1998. Degradation of chloroaromatics: Purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* 180, 296-302.
- Kim, S.I., S.H. Kim, and Y.N. Lee. 1993. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from aniline degrading *Achromobacter* gr. D.V.K-24. *Kor. J. Microbiol.* 31, 579-585.
- Kobayashi, T., T. Ishida, K. Horiike, Y. Takahara, N. Numao, A. Nakazawa, T. Nakazawa, and M. Nozaki. 1995. Overexpression of *Pseudomonas putida* catechol 2,3-dioxygenase with high specific activity by genetically engineered *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 117, 614-22.
- Konopka, A., D. Knight, and R.F. Turco. 1989. Characterization of a *Pseudomonas* sp. capable of aniline degradation in the presence of secondary carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 385-389.
- Liu, Z., H. Yang, Z. Huang, P. Zhou, S.J. Liu. 2002. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 679-682.
- Lyons, C.D., S. Katz, and R. Bartha. 1984. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 491-496.
- Milo, R.E., F.M. Duffner, and R. Muller. 1999. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. *Extremophiles* 3, 185-190.
- Moon, J., K.R. Min, C.K. Kim, K.H. Min, and Y. Kim. 1996. Characterization of the gene encoding catechol 2,3-dioxygenase of *Alcaligenes* sp. KF711: overexpression, enzyme purification, and nucleotide sequencing. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, 248-254.
- Murakami, S., Y. Nakanishi, N. Kodama, S. Takenaka, R. Shinke and K. Aoki. 1998. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Pseudomonas species* AW-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 747-52.
- Oh, J.M. E. Kang, K.R. Min, C.K. Kim, Y.C. Kim, J.Y. Lim, K.S. Lee, K.H. Min, and Y. Kim. 1997. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene encoded in TOM plasmid of *Pseudomonas cepacia* G4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 578-581.
- Parales, R.E., T.A. Ontl and D.T. Gibson. 1997. Cloning and sequence analysis of a catechol 2,3-dioxygenase gene from the nitrobenzene-degrading strain *Comamonas* sp. JS765. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 385-391.
- Schreiner, A., K. Fuchs, F. Lottspeich, H. Poth, and F. Lingens. 1991. Degradation of 2-methylaniline in *Rhodococcus rhodochrous*: cloning and expression of two clustered catechol 2,3-dioxygenase genes from strain CTM. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2041-2048.
- Yoko, N., S. Murakami, R. Shinke, and K. Aoki. 1991. Induction, purification, and characterization of catechol 2,3-dioxygenase from aniline-assimilating *Pseudomonas* sp. FK-8-2. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1281-1289.
- You, I.S., and R. Barth. 1982. Metabolism of dichloro-aniline by *Pseudomonas putida*. *J. Agric. Food Chem.* 30, 274-277.
- Zeyer, J., A. Wasserfallen, and K.N. Timmis. 1985. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an ortho-cleavage pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 447-453.

(Received January 29, 2003/Accepted March 11, 2003)

ABSTRACT : Characterization and N-Terminal Amino Acid Sequence Analysis of Catechol 2,3-dioxygenase Isolated from the Aniline Degrading Bacterium, *Delftia* sp. JK-2

Hwang, Seon-Young, Seung-Youl Song, and Kye-Heon Oh* (Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea)

The aim of this work was to investigate the characterization and sequence of catechol 2,3-dioxygenase isolated from *Delftia* sp. JK-2, which could utilize aniline as sole carbon, nitrogen and energy source. In initial experiments, several characteristics of C2,3O separated with ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose were investigated. Specific activity of C2,3O was approximately 4.72 unit/mg. C2,3O demonstrated its enzyme activity to other substrates, catechol and 4-methylcatechol. The optimum temperature of C2,3O was 30°C, and the optimal pH was approximately 8. Metal ions such as Ag⁺, Hg⁺, and Cu²⁺ showed inhibitory effect on the activity of C2,3O. Molecular weight of the enzyme was determined to approximately 35 kDa by SDS-PAGE. N-terminal amino acid sequence of C2,3O was analyzed as ¹MGVMRIGHASLKVMDMDAAVRHYENV²⁶, and exhibited high sequence homology with that of C2,3O from *Pseudomonas* sp. AW-2, *Comamonas* sp. JS765, *Comamonas testosteroni* and *Burkholderia* sp. RP007. PCR product was amplified with the primers derived from N-terminal amino acid sequence. In this work, we found that the amino acid sequence of *Delftia* sp. JK-2 showed high sequence homology of C2,3O from *Pseudomonas* sp. AW-2 (100%) and *Comamonas* sp. JS765 (97%).