

Aniline 분해세균 *Delftia* sp. JK-2에서 분리된 Catechol 2,3-dioxygenase의 N-말단 아미노산 서열 분석

황선영 · 강형일¹ · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹순천대학교 환경교육과

본 연구에서는 이전 연구에서 단일 탄소원과 질소원 및 에너지원으로 aniline을 이용하는 *Delftia* sp. JK-2에서 분리, 정제된 바 있는 C2,3O의 N-말단 아미노산과 DNA 서열을 분석하였다. Aniline에서 배양한 *Delftia* sp. JK-2에서 분리된 약 35 kDa의 C2,3O의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 MGVMRIGHASLKVMDMDAAVRHYENV²⁶로 *Pseudomonas* sp. AW-2와 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O와 일치하는 것으로 나타났다. 위에서 확인된 아미노산 서열을 바탕으로 제작된 primer와 JK-2의 total genomic DNA를 기질로 사용하여 PCR을 수행한 결과 약 950 bp의 유전자 증폭산물을 획득하였다. 이 증폭산물 중 정확히 확인된 890 bp의 염기서열을 분석한 결과 *Delftia* JK-2의 C2,3O 유전자 염기서열은 *Pseudomonas* sp. AW-2의 C2,3O와 일치하였으며 *Comamonas* sp. JS765의 C2,3O와 97%의 높은 상동성을 나타내었다.

Key words □ aniline, catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O), *Delftia* sp. JK-2

Aniline은 제약, 플라스틱, 염색, 살충제 등의 제조에 원료로서 널리 사용되어 왔다(5,8). 또한 폭발물, 아질산 아닐린계 제조제, 니트로 피렌(nitropyrene)과 같은 니트로 방향족 화합물의 미생물에 의한 전환으로 생성되며 자연계에 광범위하게 분포하는 합성 화합물이다(8). 환경에 노출된 방향족 화합물들은 주로 호기성 세균의 산화적 분해 경로를 이용하여 효과적으로 분해될 수 있다. 미생물의 방향족 화합물 분해는 초기 단계에 산소화 반응(oxygenation), 하이드록시화 반응(hydroxylation), 탈수소화 반응(dehydrogenation)을 거치며, 방향족 화합물의 주요 중간 대사산물인 catechol과 protocatechuate 등으로 전환된다. 이들 전환된 catechol과 protocatechuate는 고리 계열에서 중요한 역할을 하는 효소인 dioxygenase에 의해 촉매반응이 진행된다(1, 4, 7, 15).

Catechol의 경우 dioxygenase에 따라 두 가지 분해경로를 가질 수 있는데, catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)에 의한 ortho cleavage와 catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O)에 의한 meta-cleavage가 있다. 방향족 고리의 수산기(-OH) 사이를 절단하는 C1,2O는 catechol에 작용하여 2개의 산소를 붙게하여 cis,cis-muconate를 생성한다. 이 작용에 의해서 방향족 고리가 열리게 되고 β -keto adipate 경로를 통해 최종적으로 미생물이 직접적으로 이용할 수 있는 succinate와 acetyl-CoA로 분해된다. 고리의 수산기 외부를 절단하는 C2,3O도 마찬가지로 catechol에 두 개의 산소가 붙게 하여 2-hydroxymuconic semialdehyde를 형성하고, 이 작용으로 고리가 열리고 최종적으로 pyruvate와 acetaldehyde로 분해되는 것이 보고되고 있다(9, 13, 16-17). C2,3O에 대한 연구

는 몇몇 연구자에 의해 *Pseudomonas* sp. AW-2, *Comamonas* sp. JS765, *Rhodococcus rhodochrous* CTM 등을 포함하는 여러 종의 미생물에서 수행되어져 왔다(12, 14.). Yoko 등(19)은 aniline에서 배양한 *Pseudomonas* sp. FK-8-2에서 분리한 C2,3O의 특성조사를 보고한 바 있다. 또한 aniline을 분해하는 *Pseudomonas* sp. AW-2로부터 C2,3O를 분리하여 특성조사와 유전자 분석을 연구한 바 있다(12). Milo 등(10)은 *Bacillus thermoleovorans* strain A2에 존재하는 C2,3O가 높은 온도에서도 생산된다는 것을 보고한바 있다. 높은 온도에서 phenol을 분해하는 *Bacillus thermoglucosidasius* A7에서는 phenol 분해시 meta 경로를 이용하는 것이 확인되었고, meta 경로에 관련된 5가지 효소에 대한 클로닝과 서열 분석을 하였다(6). C2,3O의 연구는 효소학적 연구 외에도 분자유전학적인 연구가 많은 진척을 보여왔다. Schreiner 등(18)은 2-methylaniline을 분해하는 *Rhodococcus rhodochrous* CTM에서 C2,3O 유전자를 클로닝하여 발현시켰고, nitrobenzene을 분해하는 *Comamonas* sp. JS765을 이용하여 C2,3O 유전자 서열 분석하고 클로닝하여 유전자를 발현시킨 연구가 보고된바 있다(13). C2,3O에 대한 연구는 C1,2O의 연구에 비해 서서히 진행되었으나, 최근에 들어 많은 연구가 보고되고 있다.

본 연구에서는 이전 연구(7)를 통해 *Delftia* sp. JK-2에서 분리·정제되어 부분적으로 효소학적 특성이 밝혀진 바 있는 C2,3O의 특성을 보다 자세하게 밝히기 위하여 분자생물학적 수준에서 연구를 수행하여 C2,3O의 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다.

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

재료 및 방법

균주의 배양조건

균주의 배양에 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 결과는 이미 보고된 바 있다(4).

SDS-PAGE

겔럼을 통해 분리된 C2,3O는 Bollag 등(2)의 방법을 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 5분간 끓이고, 얼음에 식힌 후 주입하였다. 표지 단백질은 prestained SDS-PAGE Standard (Bio-Rad, Hercules, USA)를 사용하였다. 전기영동은 100 V에서 2시간 30분간 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 gel staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2시간 염색하였고, gel destaining solution I (10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1시간동안 처리한 후, gel destaining solution II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)으로 8시간 처리하였다.

N-말단 아미노산 서열분석

분리한 C2,3O를 SDS-PAGE 상에서 전개한 gel을 semidry electroblotter (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 18V, 20분간 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막(Applied Biosystem, 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.

Chromosomal DNA 분리

LB 배지에서 12 시간 동안 배양(30°C, 160 rpm)한 *Delftia* JK-2 30 mL을 원심분리(6,300 × g, 10 min, 4°C)하여 세포를 얻

었다. 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 반응시킨다. 10% SDS를 100 μL 첨가하고, 천천히 섞어주었다. 점도가 높아지면 50 μL proteinase K (20 mg/mL)와 5 μL RNase를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 5 mL TEN buffer를 더 첨가하고 10 mL의 phenol을 첨가하여 가볍게 섞어준다. 원심분리를 통하여 상등액을 취하여 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 추출은 2회, chloroform 추출은 1회 실시하였다. 상등액을 5 mL 취하여 500 μL 3M sodium acetate와 15 mL ethanol을 첨가하여 원심분리를 실시하였다. 침전된 염색체는 70% ethanol로 염류를 제거하고 다시 원심 분리하여 공기 중에서 ethanol을 제거하였다. 얻어진 침전물을 300 μL의 물에 녹인 후 분리여부를 확인하기 위해서 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하였고, UV-spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

Polymerase chain reaction과 염기서열 결정

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, Watertown, USA)을 실시하였다. Primer No. 1과 No. 2는 coding strand로, 그리고 No. 3와 No. 4는 complementary strand primer로 제작하여, PCR premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 증폭하였다(Table 1). PCR의 반응조건은 시작 denaturation 단계를 94°C에서 5 분간 실시하였고, 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30 초씩 30 cycles 반응하였으며, 마지막 extension 단계는 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 산물을 0.8% agarose gel에서 전기 영동하였다. 전기영동을 통해서 분리된 PCR 산물은 gel extract kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 설명서의 절차에 따라 gel로부터 추출하였다. 추출한 PCR 산물을 표지하기 위하여 ABI의 BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (ABI, Piscataway, NJ, USA)를 사용하였다. 2 μL의 BigDye, 50 ng의 DNA, 2.5 pmole의 primer를 첨가하여 25 cycle (96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분)동안 증폭하여 표지하였다. DyeEx (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 결합하지 않는 BigDye를 증폭된 DNA로부터 제거하였고, 3700 DNA analyzer (ABI, Piscataway, USA)를 이용하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 서열은 NCBI의 BLAST Search 프로그램을 이용하여 상동성 조사를 실시하였다.

Table 1. PCR primers for amplification of C2,3O

| Designation | Nucleotide sequence | Amino acid sequence | Position |
|-------------|-------------------------------------|---------------------|------------|
| No.1 | 5'-ATGGGTGTGATGCGCATCGG-3' (20 mer) | MGVMRIG | N-terminal |
| No.2 | 5'-ATGTGCGAGATGAATCCCCA-3' (20 mer) | CMLLCHD | Internal |
| No.3 | 5'-TGGTGACGGACGACTACACG-3' (20 mer) | EPNMECM | Internal |
| No.4 | 5'-AGTGGCTCCACATGTGCACT-3' (20 mer) | SFTEVYT | C-terminal |

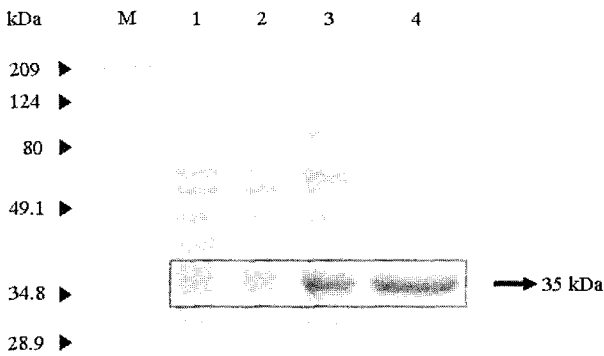


Fig. 1. SDS-PAGE of purified catechol 2,3-dioxygenase. A: marker (myosin-209, β -galactosidase-124, bovine serum albumin-80, ovalbumin-49.1, carbonic anhydrase-34.8, soybean trypsin inhibitor-28.9), B: crude cell extract, C: 30-50% saturated ammonium sulfate D: DEAE-sepharose E: DEAE-sepharose.

결과 및 고찰

C2,3O의 분자량 결정

균주 JK-2에서 분리, 정제된 C2,3O의 효소학적 특성은 이미 부분적으로 보고된 바 있다(7). SDS-PAGE 상에 전개하여 JK-2에서 분리, 정제된 C2,3O의 분자량을 측정된 결과 약 35 kDa임이 확인되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 Gibson (14)이 보고한 *Comamonas* sp. JS765와 *Alcaligenes* sp. KF711로부터 분리된 C2,3O의 분자량(11)과 그 크기가 일치하는 것으로 나타났다.

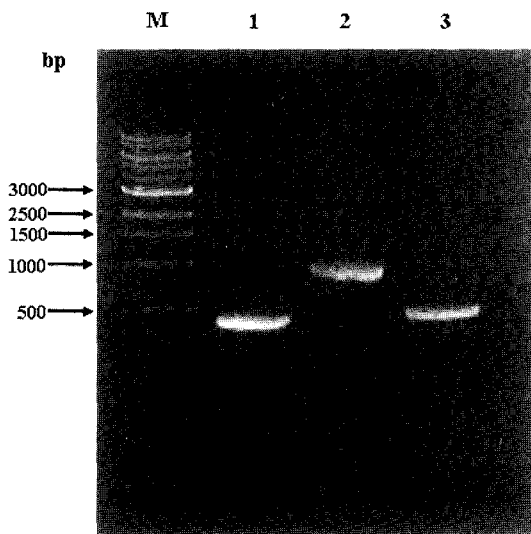


Fig. 2. PCR products of catechol 2,3-dioxygenase gene from *Delftia* sp. JK-2. Lane M, 1 kb DNA ladder; lane 1, PCR product of No. 1 and No. 3 primers (470 bp); lane 2, PCR product of No. 1 and No. 4 primers (950 bp); lane 3, PCR product of No. 2 and No. 4 primers (490 bp).

N-말단 아미노산 서열분석

아미노산 염기서열 분석기를 통하여 분석한 결과 *Delftia* sp. JK-2에서 분리한 C2,3O의 아미노산 서열은 N-말단으로부터 'MGVMRIGHASLKVMDMDAAVRHYENV²⁶'로 총 26개의 아미노산 서열이 결정되었다(Fig. 3). 분석된 26개 아미노산 서열을 BLAST Search 프로그램으로 분석한 결과 *Delftia* sp. JK-2의 C2,3O는 *Pseudomonas* sp. AW-2의 C2,3O와 *Comamonas* sp.

| | |
|---------------|--|
| JK-2 C2, 30 | 1MDAAVRHYENVLGMKTTMKDKAGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDQAGVNH |
| PAW-2 C2, 30 | 1MDAAVRHYENVLGMKTTMKDKAGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDQAGVNH |
| CJS765 C2, 30 | 1MDAAVRHYENVLGMKTTMKDKAGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDQAGVNH |
| PP C2, 30 | 1IAAAVKHYEEMVGLKTVMKDSAGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDRAGLNH |
| CT C2, 30 | 1MDAALKHYENVLGMKVTLRDAAGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDRAGLNH |
| PC C2, 30 | 1MALVAKHYENVLGMKRTMEDEHGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDQAGLNH |
| BRP007 C2, 30 | 1MALVAKHYENVLGMKRTMEDEHGNVYKLCWDEWDKYSVILTPSDQAGLNH |
| JK-2 C2, 30 | 511AYKVEKEADLEALQOKIEAWGKTTMLDEGTLPTSGRMLOKFLPSGHEN |
| PAW-2 C2, 30 | 511AYKVEKEADLEALQOKIEAWGKTTMLDEGTLPTSGRMLOKFLPSGHEN |
| CJS765 C2, 30 | 511AYKVEKEADLEALQOKIEAWGKTTMLDEGTLPTSGRMLOKFLPSGHEN |
| PP C2, 30 | 51VAYKVEKEDLEALQARI EA WGIKTTLPEGTLPTSGRMLOKFLPSGHEN |
| CT C2, 30 | 51VAYKVNDAADLSLQARI EA WGIKTTLPEGSQPTVGRMLQFDLPSGHEN |
| PC C2, 30 | 51VAYKVEHDADLALQKRI ERYGKTKQMLPEGTLPTSGRMLOKFLPSGHEN |
| BRP007 C2, 30 | 51VAYKVEHDADLALQKRI EAYGKTKQMLPEGTLPTSGRMLOKFLPSGHEN |
| JK-2 C2, 30 | 101RLYASKEFVGTDVGNINPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| PAW-2 C2, 30 | 101RLYASKEFVGTDVGNINPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| CJS765 C2, 30 | 101RLYASKEFVGTDVGNINPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| PP C2, 30 | 101RLYAKKEYVGTDVGNINPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| CT C2, 30 | 101RLYAKKECVGTDVGSLNPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| PC C2, 30 | 101RLFATKEYVGTGVTGNINPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| BRP007 C2, 30 | 101RLFATKEYVGTGVTGNINPDPPDGLKGAGAHWLDHCLLMCEMPEAGINT |
| JK-2 C2, 30 | 151VADNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPR |
| PAW-2 C2, 30 | 151VADNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPR |
| CJS765 C2, 30 | 151VADNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPR |
| PP C2, 30 | 151Q-DNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPR |
| CT C2, 30 | 151VEDNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPT |
| PC C2, 30 | 151VADNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPS |
| BRP007 C2, 30 | 151VADNTRFMTEALDFLFTQVLVGPEGNMQAATVMARTTTPHDI AFVGGPS |
| JK-2 C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| PAW-2 C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| CJS765 C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| PP C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| CT C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| PC C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| BRP007 C2, 30 | 201SGLHHIAFFLDSWHDVLSADVMKAKVRI DVAPTRHGI TRGETI YFFDP |
| JK-2 C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQRDRPVTTWTEDLGS |
| PAW-2 C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQRDRPVTTWTEDLGS |
| CJS765 C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQRDRPVTTWTEDLGS |
| PP C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQPRDPVTTWSEDMGR |
| CT C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQPRDPVTTWSEDMGR |
| PC C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQPRDPVTTWTEEHLGS |
| BRP007 C2, 30 | 251SGNRNETFAGLGYLAQPRDPVTTWTEEHLGS |

Fig. 3. Multialignment of deduced amino acid sequence of catechol 2,3-dioxygenase : sequence of C2,3O from *Delftia* sp. JK-2, PAW-2 C2,3O: sequence of C2,3O from *Pseudomonas* sp. AW-2, CJS765 C2,3O: sequence of C2,3O from *Comamonas* sp. JS765, PP C2,3O: sequence of C2,3O from *Pseudomonas putida*, CT C2,3O: sequence of C2,3O from *Comamonas testosteroni*, PC C2,3O: sequence of C2,3O from *Pseudomonas cepacia*, BRP007 C2,3O: sequence of C2,3O from *Burkholderia* sp. RP007. The N-terminal 296 amino acid sequences deduced from DNA sequences of PCR product were used to draw the phylogenetic tree. The bottom line indicates the part of the 26 N-terminal amino acid sequences determined by N-terminal amino acid sequence analysis of the C2,3O purified from strain JK-2.

JS765의 C2,3O의 N-말단의 26개 아미노산 서열과 100% 일치하는 것으로 나타났으며(12, 14). *Comamonas testosteroni*와 *Burkholderia* sp. RP007의 C2,3O의 아미노산 서열과는 84%의 상동성을 보여주었다(Fig. 3). 결정된 아미노산 서열은 JK-2로부터 유래된 C2,3O 유전자를 증폭하기 위한 primer를 합성하는데 사용하였다.

C2,3O 유전자의 PCR과 염기서열 분석

Table 1에서 보여준 primer를 이용하여 *Delftia* sp. JK-2의 염색체 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. 2). 증폭된 결과는 *Comamonas* sp. JS765에서 분리된 C2,3O의 DNA 서열로부터 예상되는 절편의 크기가 일치하는 것으로 나타났다(13). No. 1과 No. 4 primers를 사용하여 증폭된 PCR 반응 산물은 자동염기서열 분석기로 분석한 결과 950 bp 중에 890 bp의 정확한 염기서열을 얻었다. NCBI의 BLAST Search 프로그램을 이용하여 분석된 염기서열의 번역된 서열을 분석한 결과 N-말단으로부터 모두 296개의 아미노산 서열이 결정되었으며 결정된 JK-2의 C2,3O의 아미노산 서열은 *Pseudomonas* sp. AW-2와 100% 일치하였으며, *Comamonas* sp. JS765 (97%), *Pseudomonas putida* (84%), *Comamonas testosteroni* (82%), *Pseudomonas cepacia* (77%)와 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 3).

참고문헌

- 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. Edelstein. 1996. Gel electrophoresis under denaturing condition. *New York, NY, USA*. 2nd ed, 107-2.
- Bugg, T.D.H. 2001. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O₂ activation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 550-555.
- 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.
- Duffner, F.M., U. Kirchner, M.P. Bauer, and R. Muller. 2000. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene* 256, 215-221.
- Hwang, S.Y., J.W. Chun, and K.H. Oh. 2004. Characterization of different dioxygenases isolated from *Delftia* sp. JK-2 capable of degrading aromatic compounds, aniline, benzoate, and *p*-hydroxybenzoate. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19, 50-56.
- 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, and S.J. Liu. 2002. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 679-682.
- Milo, R.E., F.M. Duffner, and R. Muller. 1999. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoglucovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. *Extremophiles* 3, 185-190.
- 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, 747-752.
- Ornston, L.N. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241, 3776-3786.
- 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.
- Provident, M.A., J. Mampel, S. Macsween, A.M. Cook, and R.C. Wyndham. 2001. *Comamonas testosteroni* BR 6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology* 147, 2157-2167.
- Reineke, W., and H.J. Knacmuss. 1998. Microbial degradation of haloaromatic. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 263-287.
- Schlomann, M. 1994. Evolution of chlorocatechol catabolic pathway. *Biodegradation* 255, 735-752.
- 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.

(Received January 17, 2005/Accepted March 9, 2005)

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

Seon-Young Hwang, Hyung-Yeel Kahng¹, and Kye-Heon Oh* (Department of Life Science, Soonchunghyang University, P.O. Box 97, Asan, 336-600, Korea; ¹Department of Environmental Education, Sunchon National University, Suncheon, 540-742, Korea)

The aim of this work was to investigate the N-terminal amino acid sequence of catechol 2,3-dioxygenase isolated from *Delftia* sp. JK-2, which could utilize aniline as sole carbon, nitrogen and energy source. Molecular weight of the enzyme was determined to approximately 35 kDa by SDS-PAGE. N-terminal amino acid sequence of C2,3O from strain JK-2 was ¹MGVMRIGHASLKVMDMDAAVRHYENV²⁶, and exhibited high sequence similarity with that of C2,3O from *Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp. JS765, *Comamonas testosteroni*, or *Burkholderia* sp. RP007. Approximately 950-bp C2,3O was obtained through PCR using the primers derived from N-terminal amino acid sequence. Analysis of the DNA sequence revealed that the deduced 296 amino acid sequences were determined, and it showed 100% identity with C2,3O from *Pseudomonas* sp. AW-2 and 97% similarity with *Comamonas* sp. JS765.