

## 유기인화합물 분해효소 유전자의 재조합 및 단백질 발현

### Subcloning and Expression of a Gene Encoding an Organophosphorus Acid Anhydrolase

박재왕\*      김석찬\*      이남택\*\*  
Park Jae-Wang   Kim Seok-Chan   Lee Nam-Taek

#### ABSTRACT

Organophosphorus acid anhydrolases(OPAA) catalyzing the hydrolysis of toxic organophosphates have been found in a variety of prokaryotic and eukaryotic organisms. Of the several kinds of OPAA that can degrade nerve agents, such as DFP, sarin and soman, a OPAA gene harbored in the chromosomal DNA of *Alteromonas haloplanktis* strain was subcloned in order to develop an enzymatic degradation method of toxic organophosphorus compounds. For this 1481 bp DNA fragment containing OPAA gene and its flanking regions has been synthesized through PCR using chromosomal DNA of *A. haloplanktis* strain. After subcloning and subsequent expression, crude OPA anhydrolase was prepared and assayed. It was shown that the OPAA had a very high hydrolytic activity on DFP. The specific activity of the enzyme was  $1,110 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{protein}$ . It seemed that OPAA with such a high hydrolytic activity may give a good prospects to its use, as a biodegradation tool, in detoxifying toxic organophosphorus compounds, such as pesticides and chemical stockpiles which are posing a potential threat to the field environment and human health.

Key Word : Organophosphorus acid anhydrolase(OPAA)

#### 1. 서론

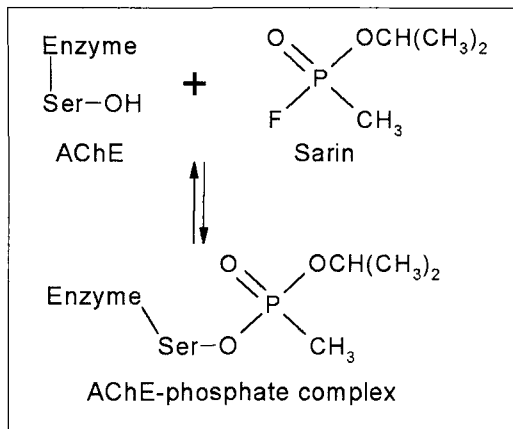
척추 및 무척추동물의 신경전달 시스템은 크게 콜린작용기전(cholinergic mechanism)과 비콜린작용기전(noncholinergic mechanism)으로 나눌 수 있다. 콜린 작용기전의 주요 신경전달물질로서 acetylcholine

(ACh)이 작용하는데, 이 ACh는 시냅스 전뉴런(presynaptic neuron)에 전달된 자극으로 인하여 시냅스 틈(synaptic cleft)으로 분비된다. 그리고 이 ACh는 다시 시냅스 후뉴런(postsynaptic neuron)의 세포막에 존재하는 수용체와 결합하므로써 시냅스 전뉴런(presynaptic neuron)으로부터 전달되어 온 신경 자극을 시냅스 후뉴런(postsynaptic neuron)의 세포에 전달하게 된다.

이러한 콜린 작용기전을 이용하여 군사적 목적으로

\* 군사과학대학원 재료과학과(졸업)

\*\* 육군사관학교 화학과 교수



[그림 1] sarin에 의한 AChE 활성억제

개발된 화합물이 바로 신경작용제이다. 콜린 작용기전을 군사적 목적으로 이용하기 위한 주요 착안점은 신경작용제를 시냅스 틈(synaptic cleft) 안으로 침투시켜, Ach 분해효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 활성을 인위적으로 비활성화 시키기 위한 것이다(그림 1). 신경작용제가 시냅스 틈에 침투하면 AChE의 활성부위에 있는 serine 잔기의 OH기와 결합해 함으로써 AChE의 ACh 가수분해 기능을 비가역적으로 억제시킨다.<sup>1</sup> 이 결과 분해되지 않은 ACh가 중추신경 및 말초신경계의 시냅스 틈에 과도하게 축적되어 지속적인 콜린효과(cholinergic effect)를 나타낸다. 이로써 호흡중추의 억압으로 인한 기관지 수축 및 경련, 과분비, 호흡근육마비 등이 야기되어 급기야 호흡장애로 인하여 사망까지 초래된다.

군사적으로 사용하는 신경작용제에는 tabun (GA), sarin(GB) 및 soman(GD) 등이 있다. 그런데 최근 이러한 G계열 유기인 화합물(organo-phosphorus compounds)을 분해할 수 있는 효소, 즉 유기인 분해효소(organo-phosphorus acid anhydrolase)가 생체 내에서 발견되어 관심을 끌고 있다. 아직까지 이 효소의 원천 기질(natural substrate)이 발견되지 않고 있지만 이 유기인 가수분해효소(organo-phosphorus acid anhydrolase : OPA anhydrolase)는 박테리아, 원생동물<sup>2</sup>, 두충류 동물<sup>3</sup>, 쌍각류 조개<sup>4</sup> 및 포유동물 등에서 발견이 되고 있다<sup>5</sup>.

첫 번째로 발견된 유기인화합물 분해효소는 phosphotriesterase라 불리는 organo-phosphorus acid hydrolase(OPH)이다. 이 효소는 *Pseudomonas diminuta* MG 및 *Flavobacterium* sp. strain (ATCC 27551)로부터 발견되었다<sup>6-9</sup>. 이들 효소는 para- oxon, DFP, soman, sarin, tabun 등을 분해할 수 있는데, 이들 각각의 효소를 발현하는 유전자를 클로닝(cloning)한 결과, 상호 동일한 유전자로 밝혀졌다. 이 유전자의 염기순서 길이는 975 bases, 단백질은 325개의 아미노산으로 이루어져 있고, 분자량은 약 35 kDa 이다<sup>10</sup>. 그리고 이 OPH 효소는 1~2개의 zinc 또는 cobalt ion을 가지고 있는 metalloenzyme 이다<sup>2,11</sup>.

두 번째로 발견된 유기인산 분해효소, OPA

oligomer DNA No.1(5' 쪽) : 5' TGACTCGAGGTAGACTCAAAGCAAGTTAAATTTAAC 3'  
XhoI

oligomer DNA No.2(3' 쪽) : 5' TGAGAATTCATAGCACTTACTTAGGCTTTAATTTAAA 3'  
EcoRI

[그림 2] Oligonucleotide probes

anhydrolase는 *Alteromonas* sp. strain, JD6.5로부터 발견되었는데<sup>12</sup>, 일명 OPAA-2라 불린다. 이 OPAA-2 역시 OPH와 마찬가지로 paraoxon, DFP, soman, sarin, tabun 등을 모두 분해시킬 수 있다는 점에서 유사한 점을 가지고 있으나 OPH에 비하여 훨씬 높은 분해 능력을 가지고 있다<sup>11,12</sup>.

세 번째로, 가장 최근에 또 다른 두 가지의 OPA anhydrolase가 *Alteromonas undina*와<sup>16</sup> *Alteromonas haloplanktis* C 로부터<sup>15</sup> 발견되었는데, 이들 두 효소는 서로 유사한 성질을 가지고 있다. 이 효소들은 DFP, sarin(GB), soman(GD) 등은 물론 GF(O-cyclohexyl methylphosphonofluoridate)까지 여러가지 종류의 화학작용제를 광범위하게 분해시킬 수 있다. 더구나 효소의 활성(activity)도 아주 높아서 군사적으로 매우 유용하게 응용될 전망이다<sup>12,15,16,17</sup>.

본 연구에서는 효소제독제 개발을 위한 기초 연구로서 *Alteromonas haloplanktis* C 박테리아로부터 신경작용제를 분해하는 효소의 유전자를 PCR기법을 이용하여 획득하였고, 이 유전자의 단백질을 BL21 박테리아 내에서 발현시킨 후, 이 효소의 신경작용제 분해 활성(activity)을 측정하였다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1 박테리아 균주 및 배양

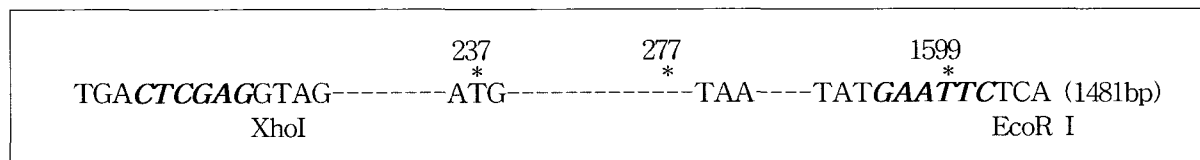
*Alteromonas haloplanktis* C 및 BL21 박테리아를

37°C에서 18~24 시간동안 배양하였다. 사용한 배지는 *Pseudomonas bathycetes* medium(3g yeast extract, 10g proteose peptone, 24g NaCl, 0.7g KCl, 5.3g MgCl<sub>2</sub>, 7g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)과 LB medium(10g tryptone, 5g yeast extract 10g NaCl)을 각각 사용하였으며, *Alteromonas haloplanktis* C 균주는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였다.

2.2 Oligonucleotide probes의 준비 및 유전자 획득  
PCR을 위한 template DNA는 *Alteromonas haloplanktis* C 박테리아로부터 분리한 chromosomal DNA를, 그리고 probes는 OPAA 유전자 순서에 따라(그림 4) 합성된 두 가지 종류의 5' 및 3'쪽 primer(각각 36 bases)를 각각 사용하였다(그림 2). Primer oligonucleotide는 Ransom Hill Bioscience (Ramona, C.A. USA)로부터 구입했다. OPAA 유전자 절편은 유전자 증폭원리(PCR)를 이용하여 OPAA 유전자 순서 237부터 1700까지 획득했으며(그림 3) 획득한 OPAA 유전자 절편은 1% agarose gel에서 확인했다(그림 5).

### 2.3 OPAA 유전자의 유전자 재조합 및 박테리아 형질변환

PCR을 통하여 획득한 OPAA 유전자 절편을(그림 3 및 그림 5) 제한효소 Xho I 과 EcoR I으로 절단하



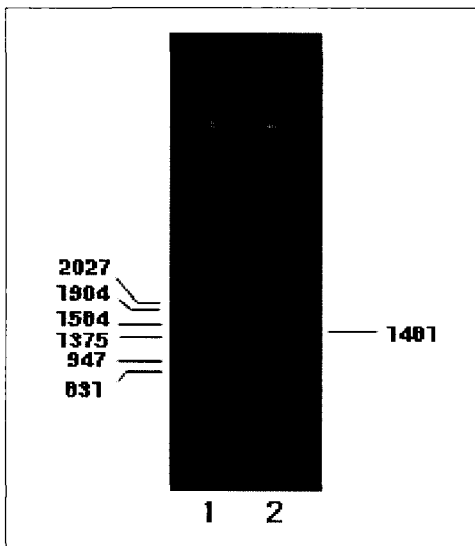
[그림 3] PCR을 통하여 획득한 OPAA 유전자 절편(1481bp).

(5' 쪽에 XhoI, 그리고 3' 쪽에 EcoR I 제한효소자리를 고안해 넣음.)

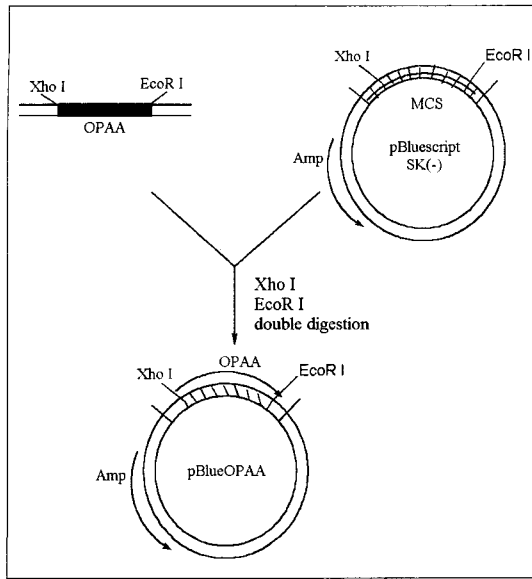
```

1 aagaagcaat gccggctgag ctatgggttg accttattcc ttacagagaa acccgagatt
61 atgtaaaaaa tgtatttgct tatcggcagg tttatcatac tcgccttggt cgggagggaa
121 accttctagc ccccatatta gaaatgacga tgggcggata gtaaaaataa atctacaacc
181 acagagggat atttacacag tagtatccct cttttttgag cgcttggtga taagtggtag
241 actcaaagca agttaaattt aacagatggg tttattatgg aaaaattagc cgttttatac
301 gccgaacata ttgcaacatt gcagcagcgt acacgtacta tttgtgagca agaagggtta
361 gaaggattag tcattcattc aggccaaagct aagcgccaat ttttagatga tatgtattac
421 ccgtttaaag ttaaccctca ttttaaagcg tggctaccgg ttattgataa tccacattgc
481 tggattgtgg taaatggtag cgataagcca aaacttattt tttatcggcc aattgatttt
541 tggcataaag tacctgatga gccaaagagat ttttgggcag aalacttcga tattgaattg
601 ttattacaac ccgatcaggt tgaaaagcta ctaccttacg ataaagctaa atttgcctac
661 attggtgaat acctcgaagt agcacaagca cttggcttta gtattatgaa ccctgagcca
721 gtactttaat statteatta ccaccgtgct tataaaacgc aatatgaact tgaatgttta
781 cgtaatgcga atcgtattgr ggttgatggc cataaagcag cgctgatgac gttttttaat
841 ggtggtagcg agtttgatat tcagcaagct tacttaatgg caacgcgcca aagtgaaaac
901 gaaatgccat atggcaatat tgtggcactt aacgaaaact gcgctatttt gcactacacc
961 cattttgagc caaaagcacc acaaacgcat aattcatttt taattgatgc gggcgctaatt
1021 tttaatgggtt acgctgcgga tattaccgct acctacgact ttaaaaagca gggtgagttt
1081 gctgacttag ttaacgctat gacagcgcgt caaattgagt taggaaaag cttaaagcca
1141 ggtttactgt atggcgatct gcatatteat tgtcataacc stattgctca gctattaagt
1201 gattttgata ttgttaaact acctgcagcc gaaattggtg agcgtcaaat tacctcaact
1261 ttcttcccgc atggccttag gcacatatta ggtgcacagg ttcacgatgt gggtggtttt
1321 atgcgtgatg aaacaggggc acatcaagcg ccaccagagg gtcatccatt cttgcgctgt
1381 actcgcttaa ttgagaaaaa ccaagtattt actattgagc caggtttgta ctttattgac
1441 tctttattag gtgatttagc acaaacagac aataagcagt ttattaactg ggaaaaggtc
1501 gaggcgttta aaccttttgg cggtatcgt atcgaggaca atattattgt tcacgaagat
1561 agcctagaaa atatgacgcg teatttatta ctcgactaaa tccttattea agacgagtta
1621 gtcaatacgc gctaaaataa acggatacaa aggggccttt tggccccatt ttttttaatt
1681 aaagcctaag taagtgctat
    
```

[그림 4] *Alteromonas haloplanktis* OPAA 유전자 순서(1-1700 bases)22  
 (아미노산 codon은 277부터 1596번째 base 까지 임).



[그림 5]  
 OPAA 유전자 절편의 전기영동(1% Agarose Gel )  
 lane 1 : marker DNA(  $\lambda$ /EcoR I-Hind III)  
 lane 2 : 합성된 OPAA 유전자 절편(1481bp)



[그림 6] pBlueOPAA plasmid DNA 조작

고 이를 pBluescript SK(-) vector의 Xho I/EcoR I 제한효소 자리에 subclone하여 pBlueOPAA plasmid DNA를 제조하였다(pBlueOPAA : 그림 6). 그리고 pBlueOPAA plasmid DNA로써 BL21 박테리아를 형질변환 시킨 다음 Amp<sup>r</sup>- cillin에 저항성이 있는 박테리아를 골라내었다.

2.4 단백질 발현 및 crude OPAA의 준비

OPAA 단백질 발현을 위하여 형질변환시킨 BL21 박테리아를 1mM IPTG를 함유한 LB 배지에서 18~24 시간 배양하였으며, crude OPAA extract 준비를 위하여 10mM Tris buffer(pH 8.0)를 사용하였다.

2.5 OPA 가수분해효소의 효소활성 측정

효소 활성 측정에 사용된 OPAA는 정제되지 않은 crude enzyme인데, 이는 박테리아를 침전시킨 후, 3차례의 freezing/thawing 및 sonication, 그리고 원심

분리를 통하여 얻었다. OPAA의 가수분해 활성은 F<sup>-</sup> 이온의 농도를 측정할 수 있는 전극을 이용하여 DFP로부터 분해되어 나오는 F<sup>-</sup> 이온의 농도를 측정하였다<sup>18</sup>. Assay 반응용액에는 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8.7, 0.1mM MnCl<sub>2</sub>, 3mM DFP, 그리고 1mg의 crude enzyme이 포함되어 있으며, 반응은 25°C에서 실시하였다. 이온전극의 F<sup>-</sup> 이온 농도 측정 단위는 ppm이며, 19 ppm은 1 mM F<sup>-</sup> 이온 농도에 해당한다. 효소활동도(activity) 1 Unit은 분당 1.0 μmole F<sup>-</sup> 이온이 분해되는 양으로(1.0 μmole F<sup>-</sup> min<sup>-1</sup>), 그리고 specific activity는 U mg<sup>-1</sup>으로 정했다.

3. 결과 및 고찰

3.1 재조합된 OPAA 유전자의 확인

PCR을 통하여 획득한 OPAA 유전자 절편을 pBluescript SK(-) plasmid DNA vector의 Xho I/EcoR I 제한자리에 subcloning 한 후, 이를 확인하기 위하여 pBlueOPAA plasmid DNA를 다시 Xho I/EcoR I 제한효소로 절단하였다. 그리고 1% agarose gel에서 subclone 된 OPAA 유전자 절편이 확인됐다(1471bp)(그림 7).

3.2 OPAA 발현 및 단백질 분자량 확인

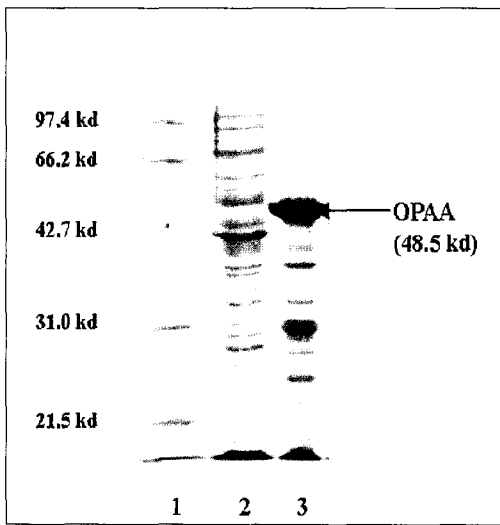
pBlueOPAA plasmid vector는 LacZ promoter를 가지고 있다. 그러므로 이 plasmid로써 형질변환(transformation)시킨 BL21 박테리아 배양시 OPAA 효소발현을 위하여 IPTG를 사용하였다. 박테리아를 18~24 시간 배양한 후 OPAA crude extract를 준비했다.

OPAA 단백질의 발현 여부 및 단백질 크기를 확인하기 위하여 1차적으로 SDS-PAGE 전기영동을 실시



[그림 7] OPAA 유전자 절편 확인:  
pBlueOPAA를 Xho I/EcoR I 으로 절단  
한 후 1% Agarose Gel 에서 전기영동  
lane 1: marker DNA  
lane 2: OPAA 유전자절편  
← 1471 bp

1 2



[그림 8] OPAA crude extract의 SDS-PAGE  
lane 1: marker protein  
lane 2: marker protein  
lane 3: crude OPAA

하였는데(그림 8), 이 결과, 48.5kDa 크기의 단백질이 IPTG에 의하여 발현된 것을 관찰할 수 있었다(lane 3). OPAA 유전자는 440개의 아미노산 codon으로 구성되어 있으며 이 효소의 이론적인 분자량은 48.4kDa 이다. 그러므로 SDS-PAGE 상에 나타난 48.5kd 크기의 단백질 띠는 예상했던 바와 같이 OPAA 유전자에 의하여 발현된 OPAA로 판단된다.

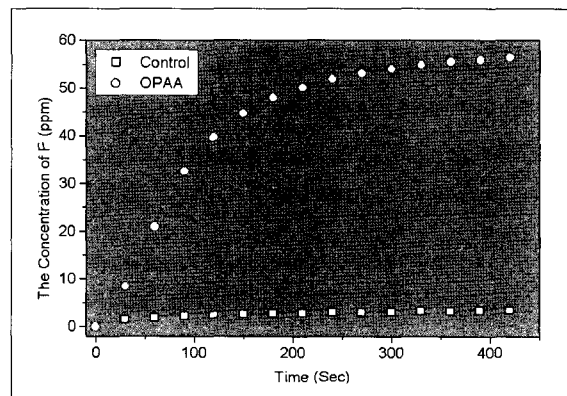
### 3.3 OPAA의 DFP 분해능력 측정

다음에는 발현된 OPAA 효소의 활성을 확인하기 위하여 crude OPAA extract의 DFP 가수분해 능력을 측정하였다. OPAA의 가수분해 활성은 OPAA에 의한 DFP 분해시 생성되는 F<sup>-</sup> 이온의 농도를 시간의 변화에 따라 측정하였다(표 1 및 그림 9).

표 1에 나타난 바와 같이, 반응 시작후 분해된 F<sup>-</sup>

[표 1] OPAA crude extract의 DFP 분해

시간(초)	F <sup>-</sup> 농도(cont.)	F <sup>-</sup> 농도(OPAA)
0	0.00	0.00
30	1.45	8.44
60	1.95	21.00
90	2.27	32.60
120	2.49	39.80
150	2.67	44.70
180	2.79	48.10
210	2.90	50.20
240	3.00	52.00
270	3.09	53.20
300	3.19	54.10
330	3.26	54.90
360	3.34	55.60
390	3.41	56.00
420	3.49	56.50



[그림 9] OPAA의 DFP 분해

이온의 농도의 변화량을 시간(초)에 따라 그래프로 그려 분석한 결과, 반응 시작 1분 경과 후, 분해된  $F^-$  이온의 농도는 21.0 ppm 이었다. 이를  $\mu\text{mole}$  단위로 환산할 경우, specific activity 값은  $1,110 \mu\text{mole } F^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ 이다. 즉,  $1,110 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$  이다. 이 값은 crude enzyme 1mg으로 1분간 204g의 DFP를 분해시키는 능력으로 계산된다. 이 결과는 Cheng 연구팀에서 *Alteromonas haloplanktis* C로부터 정제한 OPAA의 specific activity  $691 \text{ U mg}^{-1} \text{ protein}$ 의 값보다 약 2 배 정도 높은 값이다. 그러나 *Alteromonas undina* 및 *Alteromonas* sp. JD6.5로부터 정제한 OPAA의 specific activity(각각  $1,403 \text{ U mg}^{-1}$  및  $1,820 \text{ U mg}^{-1}$ )와 비교하면 효소의 활동도가 다소 떨어지는 셈이다<sup>22</sup>. 그러나 적절한 숙주 박테리아 및 배양조건을 선정하여 효소 발현효율(expression efficiency)을 높이거나, crude extract를 정제하여 효소의 순도를 높이면 효소 단위 그램 당 분해되는 DFP의 양은 훨씬 높아질 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 효소반응 용액의 조건, 즉 금속이온, pH 및 완충용액의 종류에 따라 효소의 활성이 달라지기 때문에 적절한 반응용액을 선정하면 효소의 활성을 더욱 높일 수 있을 것이다.

### 3.4 고 찰

신경작용제를 분해시키는 효소의 발견은 유기인 살충제 및 제초제에 의해 오염된 토질 및 수질 오염을 정화하는데 유용하게 응용될 수 있을 뿐만 아니라, 신경작용제에 오염된 장비 및 피부를 제독하는데 응용될 가능성이 커서 군사적으로도 매우 높은 관심을 모으고 있다. 현재 군에서는 장비 및 인원의 제독을 위하여 DS2 제독제 및 M13 제독 킷을 사용하고 있지만 피부 접촉시 인체에 미치는 독성효과, 가연성, 부식성,

그리고 자연환경을 파괴하는 점 등, 여러 가지 단점을 가지고 있기 때문에 이에 대한 대체제가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 그러므로 이러한 필요성에 의거 미 SBCCOM 산하 화생방 연구소에서는 독성 및 부작용이 전혀 없는 효소제독제가 오염된 피부 및 장비를 제독하는데 매우 이상적이라고 추천하였다<sup>19</sup>, 이러한 취지에서 해당 연구소에서는 1993년부터 현재까지 효소를 이용하여 화학 작용제를 분해시키는 연구에 박차를 가고 있다. 이러한 정책 방향 및 연구 결과로 말미암아 이미 1995년에 *Alteromonas* sp. JD6.5 박테리아로부터 유전 공학적인 방법을 이용하여 다량의 효소를 생산하는데 성공하였다. 그리고 이를 군사적으로 응용하기 위하여 분말형태의 효소를 증류수, 식수, 냇물 그리고 바닷물 등에 녹여서 DFP 및 기타 신경작용제 분해효과를 측정 한 결과 매우 바람직한 결과를 얻었을 뿐만 아니라, 이 분말형태 효소는 효소의 활성이 저하됨이 없이 4°C에서 2년 이상 보관할 수 있다고 밝혀졌기 때문에, 이는 장차 야전에서 인체 및 장비 제독을 위한 제독제로 실용화될 수 있는 가능성을 보여주는 고무적인 결과라 하겠다<sup>18</sup>.

이 외에도 이 연구소에서는 최근 *Alteromonas undina* 및 *Alteromonas haloplanktis* C 박테리아로부터 더욱 광범위한 종류의 화학작용제를 더욱 효과적으로 분해시킬 수 있는 효소의 유전자를 발견하였고, Tu-Chen Cheng 연구팀에서는 이들 효소를 이용하여 인체 및 장비 제독을 위한 실용화 차원을 목표로 연구를 계속하고 있는 것으로 밝혀졌다<sup>18</sup>.

OPAA 효소는 효소제독제 뿐만 아니라 신경작용제를 대량으로 폐기할 목적으로도 연구되고 있다. Keith E. LeJeune은 최근 *Flavobacterium* sp. 박테리아에 존재하는 OPA 분해 효소, 일명 phosphotriesterase를 polyurethane에 공유결합시켜 polyurethane-

immobilized enzyme 개발에 성공하였는데, 이 고정된 효소(immobilized enzyme)는 실온에서 매우 안정할 뿐만 아니라, 장기간 높은 효소활성을 유지한다고 한다. 그리고 효소를 반응용액으로부터 용이하게 회수할 수 있기 때문에 반복적으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 용액 상태에서 작용제를 분해시키기 때문에 소각하여 분해하는 방법(incineration)과는 달리 대기 오염을 야기시키지 않는 장점이 있다. 이 연구팀에 의하면 약 2.5kg의 polyurethane-immobilized enzyme 으로서 연간 약 3만톤의 신경작용제를 분해시킬 수 있다고 한다<sup>20</sup>. 또한 이 enzyme-impregnated polyurethane을 스폰지 형식의 얇은 filter로 제조하여, 방독면 정화통 및 보호의 내피를 보호하기 위한 prefilter 개발 목적으로도 연구가 되고 있다.

OPAA 효소를 polyurethane과 같은 solid matrix에 고정시키는 방법 외에도 OPAA 효소를 박테리아의 외막(outer-membrane)에 고정시키는 연구가 진행되고 있다. 즉, OPAA 효소와 박테리아의 outer-membrane bound protein의 fusion protein을 발견시켜 OP-AA 효소가 박테리아의 외막(outer membrane)에 고정되도록 하는 방법이다. 이처럼 박테리아 외막에 고정된 OPAA fusion protein은 OPAA가 세포질 내에 존재할 때와는 달리 기질을 박테리아의 세포막 외부에서 가수분해시킬 수가 있기 때문에 신경작용제의 대량 폐기뿐만 아니라, 유기인 살충제 및 제초제에 오염된 자연을 정화하는데 매우 효과적이고도 경제적으로 활용될 수 있다<sup>21</sup>.

#### 4. 결 론

본 연구는 효소제독제 개발을 위한 기초 연구로서

crude OPAA extract를 사용하여 DFP 가수분해 활성을 측정하였다. 이 효소를 assay한 결과 specific activity 값은  $1,110 \mu\text{mole F}^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$  이었다. 이 값은 crude enzyme 1 mg으로 1분간 약 204g의 DFP를 분해시키는 능력으로 계산된다. 그러나 만약 효소를 정제하여 순도를 높일 경우 효소의 DFP 분해능력은 훨씬 더 증가될 것이나, 단위 면적당 장비 및 피부에 오염되는 신경작용제의 농도가 그리 높지 않을 것으로 가정할 경우, 현재의 specific activity 만으로도 장비 및 피부에 오염된 신경작용제를 효과적으로 제독하는데 충분하다고 판단된다. 그리고 일반적으로 soman(GD)에 대한 OPAA의 분해능력은 DFP에 보다 약 2~3배정도 더 높으므로<sup>22</sup> 본 연구에 사용한 crude OPAA extract도 DFP 보다 soman을 2~3배정도 더 잘 분해할 것으로 보인다. 효과적인 효소제독제 개발을 위해서는 무엇보다 분해 활성이 높은 효소가 다량으로 요구되는 만큼, 향후 연구에서는 작용제 분해활성(degrading activity)이 더 높은 OPAA 유전자의 획득, 효소의 발현효율(expression efficiency)을 높이기 위한 적절한 숙주 박테리아 및 배양조건의 탐색, 그리고 효소 반응조건, 즉 용액의 pH, 완충용액의 종류 및 금속이온의 종류 등 적절한 반응용액에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

#### 참 고 문 헌

1. Koelle, G. B. 1975. Anticholinesterase agents. In "The Pharmacological Basic of Therapeutics"(L.S. Goodman and A.Gilman. eds), 5th Ed., p.445. Macmilan, New York.
2. Dumas, D. P., Drust, H. D., Landis, W. G.,



- Raushel, F. M., and Wild, J. R. 1990. Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. Arch. Biochem. Biophys. 277, 155~159.
3. Hoskin, F. C. G., Kirkish M. A., and Steinmann K.E. 1984. Two enzymes for the detoxification of organophorus compounds sources, similarities, and significance. Fund. Appl. Toxicol. 4, 165~172.
  4. Anderson R. S., Drust H. D. and Landis W.G., 1988. Characterization of a OPA anhydrase in the clam, *Rangia Cuneata*. Comp.Biochem. Physiol. 91, 575~578.
  5. Hoskin, F. C. G., and Rousch A. H. 1982. Hydrolysis of nerve gas by squid type diisopropylphosphorofluoridate hydrolyzing enzyme on agarose resin. Science 15 :1255~1257.
  6. Harper, L. L., McDaniel, C. S., Miller, C. E., and Wild, J.R. 1988. Dissimilar plasmid isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp.(ATCC 27551) contain identical opd genes. Appl. Environ. Microbiol. 44, 246~249.
  7. McDaniel, C. S., Harper, L. L., and Wild, J. R. 1989. Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene(opd) encoding a phospho-triesterase. J. Bacteril. 170, 2306~2311.
  8. Mulbry, W., Karns, J. S., Kearney, P. C., Nelson, J. O., McDaniel, C. S., and Wild, J. R. 1986. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by Southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*. Appl. Environ. Microbiol. 51, 926~930.
  9. Sedar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M., and Lancater, J. H. 1982. Plasmid involment in parathio hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. Appl. Environ. Microbiol. 44, 246~249.
  10. Mulbry, W., and Karns, J. 1989. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and the protein. J. Bacteriol. 171. 6740~6746.
  11. Omburo, G., Millins, L., and Raushel, F. 1993. Structural chracterization of divalent cation sites of bacterial phosphotriesterase by  $^{113}\text{Cd}$  NMR spectroscopy. Biochemistry 32. 9148~9155.
  12. DeFrank, J. J., Beaudry, W. T., Cheng, T-C., Harvey, S. P., Stroup, A. N., and Szafrá-niceI.I. 1993. Screening of halopholic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. Chem. Biol. Interact. 87, 141~148.
  13. Attaway, H., Nilson, J. O., Baya, A. M., Voll, M. J., White, W. E., Grimes, D. J., and Colwell,R.R. 1987. Bacterial detoxification of diisopropylfluorophosphate. Appl. Environ. Microbiol. 53, 685~1689.
  14. Cheng,T-C., Harvey,S.P. and Chen,G. 1996. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontam-

- ination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1636~1641.
15. **Liu, L., Wu, J., Wang, B., Anderson, D. M.** 1995. Purification and characterization of an organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas haloplanktis* C and *Alteromonas* sp.M. p12, In international workshop on biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. U.S. Army, ERDEC, Aberdeen Proving Ground, MD.
  16. **Cheng, T-C., Harvey, S.P. and Stroup, A.N.** 1993. Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrase from *Alteromonas undina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3138~3150.
  17. **DeFrank, J. J. and Cheng, T-C.** 1991. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrolase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* 173, 1938~1943.
  18. **Cheng T-C. and Calomiris, J. J.** 1996. A cloned bacterial enzyme for nerve agent decontamination. *Enzyme and Microbiol. Tech.* 18, 597~601.
  19. **Lin Liu,** 1997, in press.  
(미국방백서: 'Recommendations for the Disposal of Chemical Agents and Munition' 편, 1994)
  20. **Lois Ember.** Detoxifying nerve agents. *Chemical and engineering news.* Sept. 1997, pp26~29.
  21. **Richard D. Richins, Irina Kaneva, Ashok Mulchandani, and Wilfred Chen,** 1997. Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nature Biotechnology,* 15, 984~987.
  22. **Cheng, T-C, et al.** 1997. Nucleotide sequence of a gene encoding an organophosphorus nerve agent degrading enzyme from *Alteromonas haloplanktis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 18, 49~55