

Benzoate 분해세균 *Acinetobacter* sp. KS-1에서 분리된 catechol 1,2-dioxygenase의 특성 및 N 말단 아미노산 서열 분석

송승열 · 김승일¹ · 윤경하 · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹기초과학지원연구원 프로테오믹스팀

단일 탄소원 및 에너지원으로 benzoate를 이용하는 *Acinetobacter* sp. KS-1에서 분리 정제한 catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)의 특성과 아미노산 서열을 분석하였다. C1,2O는 catechol과 4-methylcatechol에 대해서 효소 활성을 나타내었으며, 활성 최적온도는 35°C이고, 활성 최적 pH는 7.5-9.0의 범위 내에 있었다. 효소활성 저해제로서 은, 수은, 그리고 구리는 *Acinetobacter* sp. KS-1의 C1,2O 활성을 억제하였다. SDS-PAGE에 의해 측정된 C1,2O의 분자량은 약 36 kDa였으며, N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과, 'MNYQQIDALVKQMNVDTAKG'²⁰로 *Acinetobacter radioresistens*의 C1,2O와 95%의 유사성을 보여주었다. In-gel 아미노산 서열 분석을 위하여 trypsin 처리와 peptide mapping을 실시하였다. MALDI-TOF를 이용하여 trypsin으로 처리된 세 개의 peptide fragment의 분자량을 분석한 결과 966.3 Da, 2081.7 Da, 그리고 1933.8 Da으로 각각 나타났는데, 이는 *A. radioresistens*의 C1,2O와 내부 서열('SQSDFNLRR'⁹, 'HGNRPSHVHYFVSAPGYR'¹⁸, 'TIEGPLYVAGAPESVGFAR'¹⁹)이 일치하는 것으로 분석되었다. N-말단 서열과 내부 서열을 바탕으로 primer를 제작하여 polymerase chain reaction을 실시하였다.

Key words □ *Acinetobacter* sp. KS-1, benzoate, catechol 1,2-dioxygenase, MALDI-TOF, PCR

방향족 화합물은 산업의 발전에 따라 농약, 염색제, 플라스틱, 석유 첨가제, 그리고 여러 화학 제품의 제조에 있어서 원료 또는 중간 물질로 널리 이용되는 화합물로서, 구조적으로 매우 안정하여 화학적 분해가 어렵고 화학적 독성이 강할 뿐 아니라 부분별한 사용은 생태계의 환경오염원으로 작용할 수 있다(1, 20). 호기적 조건에서 미생물의 방향족 화합물의 분해는 초기 단계에서 산소화 반응(oxygenation), 하이드록시화 반응(hydroxylation), 탈수소화 반응(dehydrogenation)을 거치면서 주요 중간대사산물인 한 개 또는 두 개의 치환기가 붙어 있는 catechol로 전환된다. Catechol은 분해과정은 다른 두 종류의 dioxygenase가 관여하여 다른 과정으로 분해가 일어난다(11). 방향족 고리의 수산기 사이를 절단하는 catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)는 catechol에 작용하여 2개의 산소 원자가 붙게 되면서 *cis,cis*-muconate를 생성한다. 이 반응에 의해서 방향족 고리가 열리게 되고, β -keto adipate 경로를 통해 최종적으로 미생물이 직접적으로 이용할 수 있는 succinate와 acetyl-CoA로 분해되며, 이들 대사 산물들은 TCA 회로를 통해 탄소원과 에너지원으로 이용된다(15). C1,2O에 대한 연구는 많은 종류의 세균에서 이루어졌다. *Pseudomonas arvilla* C-1에서 32 kDa와 30 kDa의 동형 이합체를 이루고 있는 C1,2O에 대한 정체와 특성조사가 보고된 바 있고(9), *Acinetobacter calcoaceticus*에서 C1,2O의 기질에 대한 특이성과 면역학적 기법

을 이용한 연구가 진행되었다(17). 사용되는 기질에 따른 C1,2O의 발현 양상을 알아보기 위하여, 탄소원으로 phenol과 benzoate를 이용하여 배양한 *Acinetobacter radio-resistens*에서 다른 종류의 C1,2O를 분리하였고(6), 또한 여러 종류의 다른 기질에서 발현되는 단백질을 관찰하기 위해서 2-D 전기영동 방법을 사용하여 발현 단백질의 현상을 규명하였다(16). C1,2O와 관련하여 많은 연구가 그람 음성 세균 중심으로 진행되어왔으며, 최근에는 그람 양성 세균에서도 연구결과가 보고되고 있다. Benzyl alcohol에서 배양한 *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259에서는 다양한 기질에 대한 활성이 있는 C1,2O가 분리되었으며(22), *Arthrobacter* sp. BA-5-17에서는 4종류의 다른 C1,2O가 분리되었다(14). C1,2O의 효소학적 연구 외에도 분자유전학적인 연구도 많은 진척을 보여왔다. C1,2O에는 *catA* 유전자에 암호화되어 있는데, *Streptomyces setonii*에서는 degenerate primer를 이용하여 DNA 절편을 증폭함으로써 C1,2O의 유전자를 확인하였다(3). *A. radioresistens*에서는 *catA*와 muconate lactonizing enzyme를 암호화하는 *catB*를 분석하여 그들의 유사성을 밝혀지기도 하였다(8). *Acinetobacter* sp. strain ADP1를 benzoate가 함유된 배지에서 생장시켜 Lys-R type의 전사 조절단백질인 BenM과 CatM을 발견하였다(10). 본 연구에서는 *Acinetobacter* sp. KS-1에서 분리 정제한 C1,2O에 대하여 다양한 환경조건과 기질에 따른 활성도를 측정하였고, 이 효소의 특성과 저해 요소를 조사하였다. 또한 아미노산 서열분석과 MALDI-TOF 이용한 아미노산 분자량 분석을 통하여 다른 세균들이 가지고 있는 C1,2O와

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

비교 분석하였으며, 분석된 아미노산서열로부터 조작된 primer를 사용하여 C1,2O의 암호화하는 유전자를 증폭하였으며, 유전자 서열분석과 cloning 기법을 통한 *Acinetobacter* sp. KS-1이 생산하는 C1,2O의 유전자 구조분석을 진행할 것이다.

재료 및 방법

세균의 배양

Acinetobacter sp. KS-1은 3.4 mM MgSO₄, 0.3 mM FeSO₄, 0.2 mM CaCO₃, 10 mM NH₄Cl, 10 mM succinate가 포함된 potassium phosphate 완충용액(pH 6.25)에 전 배양한 후, 탄소원으로 succinate 대신에 5 mM benzoate가 함유된 배지에서 37°C, 160 rpm으로 진탕 배양하였다.

시료 준비와 효소의 분리

효소 분리를 위하여 배양된 *Acinetobacter* sp. KS-1를 분광광도계(Beckman DU7500 UV-vis spectrophotometer, Beckman, Palo Alto, USA)를 이용하여 600 nm에서 O.D.가 1.0일 때 250 ml의 원심분리 튜브에 넣고 12,000×g에서 20 분동안 원심분리를 실시하였으며, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액으로 3회 세척하였다. 준비된 세포를 French pressure (SLM FA-078, SLM Aminco, Urbana, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 용액은 원심분리(L7 Ultracentrifuge, Beckman, Palo Alto, USA)를 실시하여 (20,000×g, 20 min, 4°C), 상등액을 취하였다. 상등액을 30% 포화 ammonium sulfate로 만들기 위해 천천히 교반하면서 1 당 176 g의 ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, USA)를 첨가한 후, 1 시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 12,000×g에서 20 분간 원심분리를 실시하여 침전물을 제거하고, 상등액을 취하였다. 상등액에 1 당 162 g의 ammonium sulfate를 위와 같은 방법으로 첨가하여 55% 포화 ammonium sulfate를 만들어 12,000×g에서 20 분간 원심분리하여 침전물을 취하였다. 침전물은 15 ml의 50 mM Tris 완충용액(pH 8.0)에 30 분간 완전히 재현탁하였다. 50 mM의 Tris 완충용액에 재현탁한 침전물을 투석막(Sigma, St. Louis, USA)에 넣고 2 l의 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 10 시간 이상 투석 후 새로운 완충용액에서 다시 투석을 실시하였다. 투석을 실시한 시료 용액을 DEAE-sepharose 컬럼(2.5 × 20 cm)에 주입하여 NaCl의 농도를 0.1에서 0.5 M로 증가시키면서 2 ml/min의 유속으로 용액을 용출하였다. 용출액은 C1,2O의 활성이 있는 부분을 모아서 단백질 정량을 실시하고, 다시 FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden)의 HR5/5 MonoQ 컬럼 (0.25 × 5 cm)에 주입하였다. 단백질은 유속 0.5 ml/min, NaCl의 농도를 0.1에서 0.5 M로 증가시키면서 30 분 동안 용출하였다. 용출액은 분취기로 0.5 ml씩 모아서 효소 활성측정을 통해 효소를 분리하였고 분리한 용액은 Bradford 방법(5)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 컬럼을 통해 분리된 C1,2O는 Bollag 등(4)의 방법을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating gel은 12%의 acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 5%의 acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. 시료는 Bradford 방법으

로 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, USA)를 사용하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 60V, 30 분간 전기 영동을 실시하였고, separating gel에서는 100V, 2 시간 전기 영동을 실시하였다. 전기 영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색을 한 후 탈염액은 40% methanol과 10% acetic acid가 함유된 용액에서 3회 실시하였다.

효소 활성 측정

Catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O)의 활성 측정은 *cis,cis*-muconate의 생성에 의해 측정되는 Aoki 방법(2)에 의해서 실시되었다. 2 ml의 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 10 μl의 100 mM catechol, 그리고 효소 정제 과정을 통하여 분리된 시료를 10 μl 첨가하여 260 nm에서 측정하였다. 반응 산물인 *cis,cis*-muconate의 몰 흡광계수 (molar extinction coefficient)는 19,000 M⁻¹cm⁻¹이며, 1 unit를 24°C에서 분당 1 μmole의 *cis,cis*-muconate을 생산하는 효소량으로 정하고, 고유활성(specific activity)은 unit/mg로 정하였다. 기질 특이성을 알아보기 위해서 기질로 사용되는 여러 catechol 유사 기질인 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 4-nitrocatechol, 그리고 3-methoxycatechol을 같은 농도로 첨가하여 실시하였다. pH에 의한 효소 활성 영향에 대한 실험은 pH 5.0-7.5에서는 50 mM의 potassium phosphate 완충용액을 pH 8.0-12.0에서는 50 mM의 Tris base 완충용액을 이용하여 측정하였다. 온도에 따른 효소 활성 변화에 대한 실험은 25-45°C에서 효소를 catechol과 10 분간 반응시키고 0.4 N HCl로 반응을 멈추게 한 후 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 억제제에 대한 실험에서는 억제제의 최종 농도가 0.1 mM로 첨가한 후에 5 분 동안 효소반응을 실시하였다.

염색체 DNA 분리

LB 배지에서 12 시간 동안 배양 (37°C, 160 rpm)한 *Acinetobacter* sp. KS-1 30 ml을 원심분리 (12,000×g, 20 min, 4°C)하여 세포를 얻었다. 침전된 세포를 5 ml TEN buffer [0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), 0.01 M EDTA, 1 M 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 30 분간 반응시켰다. 5 ml TEN buffer를 더 첨가하고 10 ml의 phenol을 첨가하여 가볍게 섞어준다. 원심분리를 통하여 상등액을 취하여 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 추출을 2회, chloroform 추출은 1회 실시하였다. 상등액을 5 ml을 취하여 500 μl 3 M sodium acetate와 15 ml absolute ethanol을 첨가하여 원심분리를 실시하였다. 침전된 염색체는 70% ethanol로 염류를 제거하고 다시 원심분리를 하여 공기중에서 ethanol을 제거하였다. 얻어진 침전물을 300 μl의 물에 녹인 후 분리 여부를 확인하기 위해서 0.8%의 agarose gel에 전기영동을 실시하였고, UV-

spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

N-말단 아미노산 서열분석

분리한 C1,2O를 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 자동 서열 분석기 Model 491A (Perkin Elmer, Foster City, USA)를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였다. 여기서 얻어진 N-말단 서열은 NCBI의 BLAST search 프로그램에서 동정하였다.

In-gel digestion과 MALDI-TOF

SDS-PAGE를 통해 분리한 gel을 50% acetonitrile과 0.2 M ammonium bicarbonate로 3 회 탈수시키고, 공기 중에서 30 분간 건조시켰다. Trypsin digestion은 0.02% Tween 20을 함유한 0.2 M ammonium bicarbonate에 1 µg trypsin (Promega, Madison, USA)을 첨가하여 30°C에서 24 시간 동안 반응시켰다. 소화된 peptide 절편은 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)가 함유된 60% acetonitrile에서 30 분간 반응시켜 3 회 추출하였다. 추출한 시료는 원심분리 진공 농축기(Savant, GMI Inc., Clearwater, USA)에서 농축을 실시하였다. 농축된 시료를 0.06% TFA 20 µl에 녹이고, PE Brownlee (Norwalk, USA)사의 aquapore C-18 컬럼 (2.1×300 mm)이 들어있는 172/140C HPLC (Perkin Elmer, Foster City, USA)를 이용하여 210 µl/min으로 60 분 동안, acetonitrile 농도를 10-80%로 증가시켜 214 nm에서 관찰하면서 잘려진 peptide를 분리하였다. 분리된 peptide는 Voyager DE-STR MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) Mass spectrometer (PerSeptive System, Framingham, USA)를 이용하여 분자량을 분석하였다.

Polymerase chain reaction

N-terminal 서열과 internal 서열을 통하여 얻어진 아미노산 서열로부터 degenerate primer를 합성하여 PCR (GeneAmp PCR system 9700, Perkin Elmer, Foster City, USA)을 실시하였다. Primer No. 1과 No. 2는 coding strand primer로, 그리고 No. 3와 No. 4는 complementary strand primer로 제작하여, PCR premix kit를 사용하여 증폭하였다. PCR 운전 조건은 시작 denaturation 단계를 94°C에서 5 분간 실시하였고, 94°C에서 1

분, 45°C에서 1 분, 72°C에서 1 분씩 25 cycle을 반응하였고, 마지막 extension 단계는 72°C에서 7 분간 실시하였다.

결과 및 고찰

C1,2O의 분리

Crude extract 상태의 효소 용액을 30-50%의 ammonium sulfate 침전을 통하여 단백질의 양을 절반으로 줄였고, C1,2O의 등전점이 낮은 pH에서 나타나는 것으로 알려져 음이온 교환체인 DEAE-sepharose와 MonoQ 크로마토그래피를 거쳤고 최종적으로 얻어진 효소는 crude extract에 비하여 20배 이상 농축된 것으로 나타났다. 최종적으로 분리한 효소는 회수율이 2.3%로 나타났고, specific activity는 12.6 units/mg을 나타냈다. 각 단계에서 분리해낸 효소 용액의 단백질 정량과 효소 활성 측정하여 표로 작성하였다(Table 1). 각 단계에서 얻어진 시료를 SDS-PAGE 상에 전개하여 C1,2O의 정제 여부를 확인하였고, 최종적으로 C1,2O가 정제됨을 관찰하였다(Fig. 1). 그리고 C1,2O의 분자량이 약 36 kDa임을 확인하였다. *A. radioresistens*는 약 38 kDa IsoA와 37 kDa IsoB의 두 가지 C1,2O를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데(6), 본 연구에서 확인된 *Acinetobacter* sp. KS-1의 C1,2O는

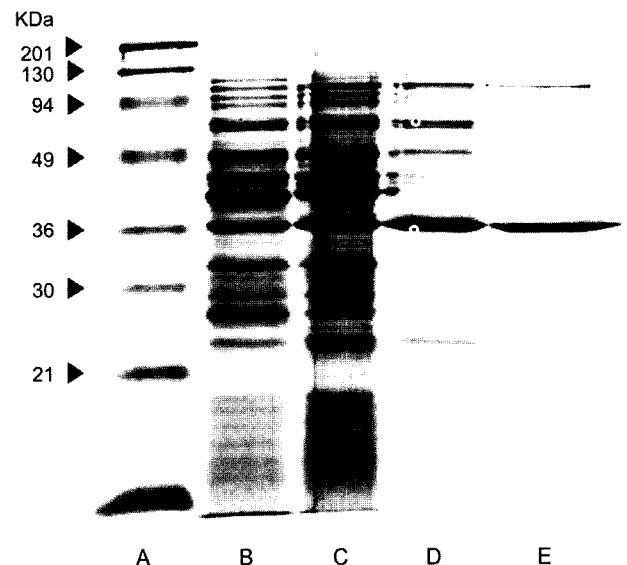


Fig. 1. SDS-PAGE of purified catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. KS-1. A: marker B: crude cell extract, C: 30-55% saturated cell extract with ammonium sulfate, D: DEAE-sepharose, E: MonoQ.

Table 1. Purification of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. KS-1

| Purification step | Volume (ml) | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (units/mg) | Yield (%) | Purification factor |
|--------------------------|-------------|--------------------|--------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| Crude extract | 42 | 107.52 | 110.88 | 1.031 | 100 | 1 |
| Ammonium sulfate | 15 | 56.25 | 73.95 | 1.315 | 66.7 | 1.28 |
| Fast-Flow DEAE-Sepharose | 8 | 2.4 | 12 | 5 | 10.8 | 4.85 |
| MonoQ | 2 | 0.2 | 2.52 | 12.6 | 2.3 | 12.22 |

Table 2. Substrate specificities of catechol 1,2-dioxygenase

| Substrates | Relative activity (%) |
|-------------------|-----------------------|
| Catechol | 100 |
| 3-Methylcatechol | 4.7 |
| 4-Methylcatechol | 58.6 |
| 4-chlorocatechol | 5.4 |
| 4-Nitrocatechol | 0 |
| 3-Methoxycatechol | 1.2 |

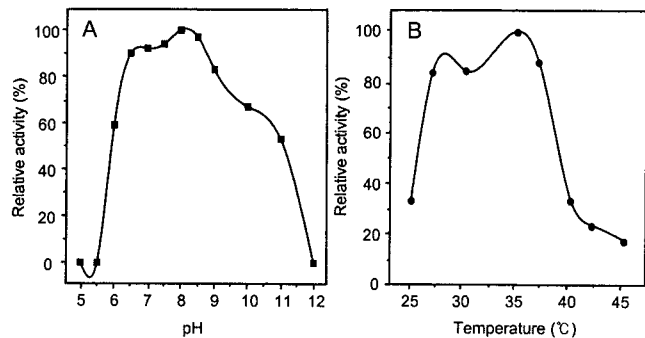


Fig. 2. Effects of pH and emperature on catechol 1,2-dioxygenase activity. (A) Effect pH on catechol 1,2-dioxygenase activity, pH 5~7.5: 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8~12: 50 mM Tris base buffer. The relative activity was calculated as the activity at pH 8.0 was 100%. (B) Effect of temperature on catechol 1,2-dioxygenase activity. The relative activity was calculated as the activity at 35°C was 100%.

IsoB와 유사성이 있는 것으로 확인되었다.

기질 특이성과 pH/온도에 대한 영향

분리된 C1,2O를 catechol과 4-methylcatechol (58.7%)을 기질로 이용하였지만 3-methylcatechol, 4-chlorocatechol, 4-nitrocatechol, 3-methoxycatechol 등을 기질로 이용하지 못하였다(Table 2). Benzoate 상에서 배양하여 얻은 C1,2O는 특정 기질에 대해서만 활성을 갖는 것으로 나타났고, pH와 온도에 안정한 것으로 나타났다. pH와 온도가 C1,2O의 활성에 미치는 영양에 대한 조사에서는 pH 5.0에서는 활성이 전혀 나타나지 않았고, pH 6.5이상에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 pH 8.0에서 최고의 활성을 나타내었고, 적정 pH는 7.5-9로 나타났다(Fig. 2). 적정 온도는 35°C로, 온도가 37°C 이상으로 증가하면 활성은 급격히 감소하여 40°C 이상에서는 활성이 30% 이하로 낮아졌다. *A. calcoaceticus* ADP1 C1,2O는 본 실험 결과와 유사하게 pH는 7-9, 온도는 35-37°C에서 효소의 적정 활성이 나타났다. *A. radioresistens*를 phenol과 benzoate에서 각각 배양하여 효소의 발현 양상과 효소의 특성에 연구에 대한 결과를 보면, phenol에서 배양하였을 경우에는 *IsoA*가 90% 이상 발현되었고, benzoate 상에서는 *IsoA*와 *IsoB*의 비율이 40:60으로 나타났다. *IsoA*와 *IsoB*는 42~47°C의 높은 온도에서도 활성을 나타냈고, pH 6에서 안정한 활성을 나타내었다(6). *Acinetobacter* sp. KS-1에서 분

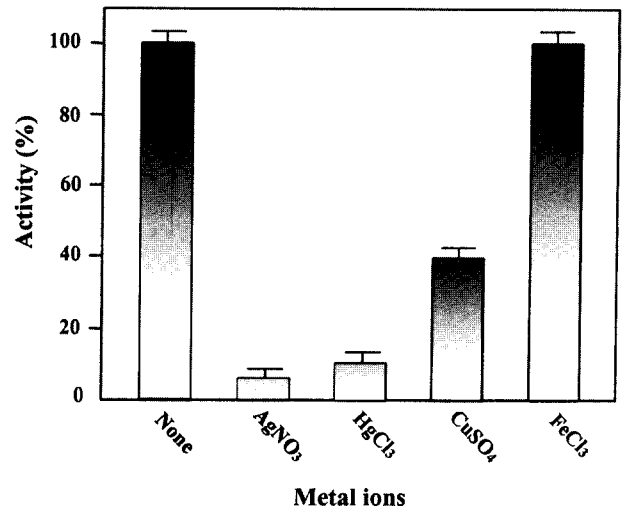


Fig. 3. Effects of various metal ions on the activity of catechol 1,2-dioxygenase. The final concentration of inhibitors was 0.1 mM. Each bar represents the average of three independent experiments.

리된 C1,2O의 활성을 비교해 본 결과 pH와 온도에 따른 활성 측정은 *A. calcoaceticus* ADP1의 특성과 유사성이 있는 것으로 나타났고, 아미노산 서열에서 높은 유사성을 보여준 *A. radioresistens* C1,2O는 *Acinetobacter* sp. KS-1에 비해 높은 온도와 낮은 pH에서 최대 활성을 나타내는 것으로 나타났다. *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259의 경우는 catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol에 대해 활성을 가지며 적정 pH가 9로 나타났으며, *Pseudomonas putida* C1은 catechol과 4-methylcatechol에만 활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(19). *Rhodococcus rhodnii* strain 135와 *Rhodococcus rhodochrous* strain 89는 pyrocatechol보다도 3-methyl-pyrocatechol과 4-methylpyrocatechol에서 더 높은 활성을 나타낸 것으로 알려져 있다(21).

효소 활성 저해제

금속에 의한 C1,2O의 효소활성 억제에 대한 조사에서 Hg⁺, Ag⁺, Cu²⁺는 C1,2O에 대하여 각각 10%, 7%, 40% 정도로 효소 활성이 저해되는 것으로 나타났지만, Fe³⁺에 의해서는 억제되지 않았다. C1,2O는 구조 내에 철(II)를 포함하고 있기 때문에 기질과의 반응 시에 철이 조효소의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(7,18). 본 실험에서도 철 이온은 효소의 활성에 영향을 주지 않거나 효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). *Achromobacter* gr. D.V. K24에서 분리된 C1,2O를 이용한 연구에서 Cu²⁺, EDTA에 대해서는 억제효과가 나타나지 않았지만, 역시 Ag⁺에 대해서는 97% 가량의 억제효과가 나타나는데 단백질 내에 sulphhydryl group에 Ag⁺가 결합하여 억제되는 것으로 보고되었다(12).

N-말단 아미노산 서열 분석

분리한 C1,2O를 아미노산 염기 서열 분석기를 통하여 N-말단

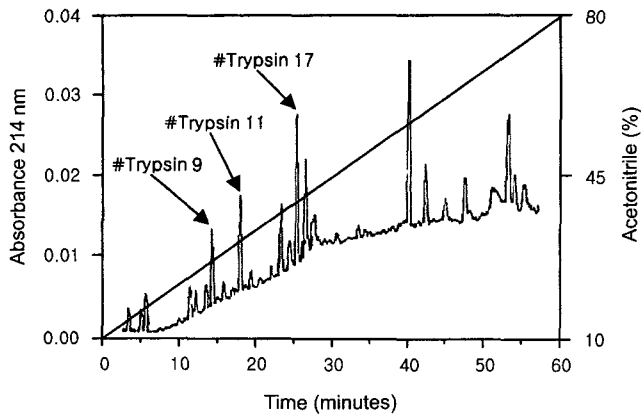


Fig. 4. Sequence alignment of catechol 1,2-dioxygenase with *Acinetobacter* sp. KS-1, *A. radioresistens*, *A. calcoaceticus* and *A. calcoaceticus* ADP1. The catechol 1,2-dioxygenase of *Acinetobacter* sp. KS-1 showed 95% identity and 95% similarity with catechol 1,2-dioxygenase of *A. radioresistens*.

으로부터 분석한 아미노산 서열은 'MNYQQIDALVKQMN-VDTAKG²⁰'로 나타났다. 분석된 아미노산 서열을 BLAST search 프로그램에서 검색한 결과 *A. radioresistens*의 C1,2O와는 95%, *A. calcoaceticus*의 C1,2O와 75% 그리고 *A. calcoaceticus* ADP1 C1,2O와는 20%의 유사성이 있는 것으로 나타났다. *Acinetobacter*에 속하는 균주들의 C1,2O와 많은 유사성이 있는 것으로 나타났다. N-말단에서 분석된 20개의 아미노산 서열은 *A. radioresistens*의 C1,2O Iso B와 하나의 아미노산 서열의 차이만을 보여주었다(Fig. 4). C1,2O Iso B는 306개의 아미노산으로 이루어져 있으며, IsoA와 IsoB와의 유사성은 59%로 보고되었으며, benzoate IsoA와 IsoB의 비율은 4:6으로 나타났다(6).

In-gel digestion과 MALDI-TOF

SDS-PAGE로 분리한 C1,2O를 트립신으로 처리하여 얻은 peptide를 170/140C HPLC를 이용하여 분리한 결과 여러 종류의 peptide 절편들을 분리하였다(Fig. 5). 흡광도 수치가 높은 trypsin-9, 11, 17을 선택하여, MALDI-TOF를 실시한 결과 분자

량이 966.3 Da (¹SQSDFNLR⁹), 2081.7 Da (¹TIEGPLYVAGAPESVGFAR¹⁹), 1933.8 Da (¹HGNRPSHVHYFVSA-PGYR¹⁸)으로 각각 확인되었다. *A. radioresistens* C1,2O를 트립신으로 처리하였을 때 예상되는 peptide fragment의 분자량을 ExPASy-Peptide Mass 프로그램 상에서 분석한 결과 *Acinetobacter* sp. KS-1 C1,2O에서 얻어진 peptide fragment와 동일한 분자량의 peptide fragment를 확인하였다(8). N-말단과 내부 서열 분석을 통하여 분석한 결과 *A. radioresistens* C1,2O와 상당 부분에서 일치하는 것으로 확인되었다.

C1,2O의 유전자 PCR

Table 3에서 보여준 primer를 이용하여 *Acinetobacter* sp. KS-1의 염색체 DNA를 PCR한 결과 No. 1과 No. 3 primer로 증폭된 570 bp, No. 1과 No. 4 primer로 증폭된 700 bp, No. 2와 No. 3 primer로 증폭된 600 bp, 그리고 No. 2와 No. 4 primer를 이용해서는 750 bp 절편이 증폭되었다(Fig. 6). 증폭된 결과는 *A. radioresistens*에서 분리된 C1,2O의 DNA 서열로부터 예상되는 절편의 크기가 일치하는 것으로 나타났고(8), PCR로 얻어진 절편은 유전자 서열분석을 통하여 좀 더 많은 균주들과의 유사성을 분석하고, Southern blotting에서 C1,2O를 암호화하는 유전자를 찾는 probe로 이용될 것으로 기대된다.

본 실험에서 benzoate를 기질로 하여 배양된 *Acinetobacter* sp. KS-1에서 생산된 C1,2O를 분리 정제하여 물리화학적 특성 규명하였으며, 이를 통하여 C1,2O는 지금까지 다른 세균에서 보고된 C1,2O의 특성과 매우 유사함이 밝혀졌다. Caposio 등(8)이 보고한 *A. radioresistens*의 C1,2O에서의 N-말단 서열 분석 연구는 본 연구에서 수행된 *Acinetobacter* sp. KS-1의 C1,2O에서 N-말단 서열을 분석 결과와 유사성이 높은 것으로 확인되었으며, MALDI-TOF를 이용한 내부 서열 분석에서도 서열이 일치하는 것으로 분석되었다. *A. calcoaceticus* ADP1에서의 C1,2O에 대한 실험 결과는 *Acinetobacter* sp. KS-1과 유사성이 비교적 낮은 것으로 나타났지만, 효소의 활성 특성에서는 연관관계가 있는 것으로 확인되었다(10). 향후 본 연구에서 얻어진 결과를 바탕으로 기질의 종류에 따라 *Acinetobacter* sp. KS-1에서 다르게 발현되

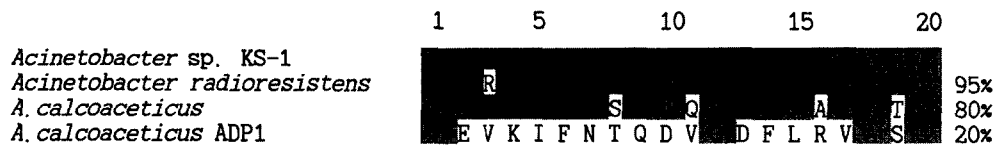


Fig. 5. RP-HPLC separation of trypsin digestion of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. KS-1. Samples which showed the peaks of trypsin-9, 11, and 17 were manually collected at 214 nm and used for MALDI-TOF. The MS spectra were obtained in delayed extraction mode using an accelerating voltage of 20 kV and 150 ns delay.

Table 3. Design of oligonucleotide for PCR

| Designation | Nucleotide sequence | Amino acid sequence | Position |
|-------------|--|---------------------|---------------------|
| No. 1 | ATGAA(C/T)TCA(A/G)CA(A/G)AT(C/G/T)GA | MNYQQI | N-terminal sequence |
| No. 2 | AA(A/G)CA(A/G)ATGGT(A/C/G/T)GA(C/T)AC | KQMNVDI | internal sequence |
| No. 3 | AG(A/G)TT(A/G)AA(A/G)TC(A/C/G/T)GA(C/T)TG | LNFDSD | internal sequence |
| No. 4 | AC(A/G)AA(A/G)TA(A/G)TG(A/C/G/T)AC(A/G)TG(A/C/G/T)GA | VFYHVHS | internal sequence |

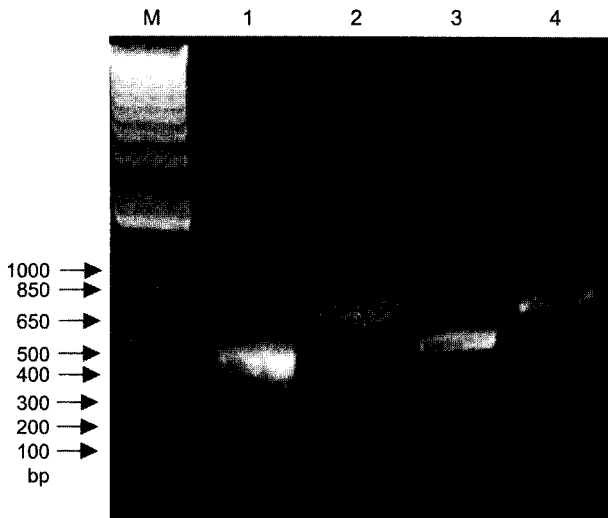


Fig. 6. PCR products of *catA* gene from *Acinetobacter* sp. KS-1. Lane M, DNA-1 kb plus DNA ladder; lane 1, PCR product of No. 1 and No. 3 primers (570 bp); lane 2, PCR product of No. 1 and No. 4 primers (700 bp); lane 3, PCR product of No. 2 and No. 3 primers (600 bp), lane 4, PCR product of No. 2 and No. 4 primers (750 bp).

는 C1,2O의 패턴과 관련 유전자의 분자생물학적 특성 규명 실험이 진행될 것이다.

참고문헌

- Alexandar, M. 1981. Biodegradation of chemical environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Aoki, K. K. Tsukasa, S. Ryu, and N. Hiroshi. 1984. Two catechol 1,2-dioxygenase from an aniline-assimilating bacterium, *Frateriaria* species ANA-18. *Agric. Bio. Chem.* 48, 2097-2104.
- An, H.R., H.H. Park, and E.S. Kim. 2001. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 17-22.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelstein. 1996. Gel electrophoresis under denaturing condition, 2nd ed. 107-172, New York, NY, USA.
- 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.
- Briganti F., E. Pessione, C. Giunta, R. Mazzoli, and A. Scozzafava. 2000. Purification and catalytic properties of two catechol 1,2-dioxygenase isoenzyme from benzoate grown cells of *Acinetobacter radioresistens*. *J. Protein Chem.* 19, 709-716.
- Broderick, J.B. 1999. Catechol dioxygenase. *Essays Biochem.* 34, 173-189.
- Caposisio, P., E. Pessione, G. Giuffrida, A. Conti, S. Landolfo, C. Giunta, and G. Gribaudo. 2002. Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Res. Microbiol.* 153, 69-74.
- Chieko N., H. Kihachiro, K. Seiki, K. Hiroyuki, and N. Mitsuhiro. 1990. Three isoenzyme of catechol 1,2-dioxygenase, $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ and $\beta\beta$, from *Pseudomonas arvilla* C-1. *J. Biol. Chem.* 265, 660-665.
- Collier, L.S., G.L. Gaines III, and E.L. Neidle. 1998. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcription activator. *J. Bacteriol.* 180, 2493-2501.
- Kaschabek, S.R. and W. Reineke. 1993. Degradation of chloroaromatic: Purification and characterization of maleylacetate reductase from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 175, 6075-6081.
- 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.VK24, Kor. *J. Microbiol.* 31, 579-585.
- Kim, S.I., S.J. Kim, S.H. Leem, K.H. Oh, S. Kim, and Y.M. Park. 2001. Site-directed mutagenesis of two cysteines (155, 202) in catechol 1,2-dioxygenase I 1 of *Acinetobacter lowffii* K24. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34, 171-175.
- Murakami, S., C.L. Wang, A. Naito, R. Shinke, and K. Aoki. 1998. Purification and characterization of four catechol 1,2-dioxygenase isoenzyme from the benzamide-assimilating bacterium *Arthrobacter* species BA-5-17. *Microbiol. Res.* 153, 163-171.
- Ornston, L.N., and R.Y. Stanier., 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241, 3776-3786.
- Pessione, E., M.G. Giuffrida, R. Mazzoli, P. Caposisio, S. Landolfo, C. Giunta, and G. Gribaudo. 2001. The catechol 1,2-dioxygenase system of *Acinetobacter radioresistens*: isoenzymes, inducers and gene localisation. *J. Biol. Chem.* 382, 1253-1261.
- Ramesh, N.P., C.T. Hou, A. Felix, and M.O. Lillard. 1976. Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 127, 536-544.
- Rathinam, V., P. Mallayan, B. Thailampillai, and P.M. Thomas. 1998. Functional models for catechol 1,2-dioxygenase. synthesis, structure, spectra and catalytic activity of certain tripodal iron (III) complexes. *Inorg. Chem.* 37, 2943-2951.
- Ridder, L., F. Briganti, M.G. Boersma, S. Boeren, E.H. Vis, A. Scozzafava, C. Veeger, and I.M. Rietjens. 1998. Quantitative structure/activity relationship for the rate of conversion of C4-substituted catechols by catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* C1. *Euro. J. Biochem.* 257, 92-100.
- Rochkind-Dubinsky, M., G.S. Saylor, and J.W. Blackburn. 1987. Microbiological decomposition of chlorinated aromatic compounds, Marcel Dekker, Inc.
- Solyanikova, I.P., E.L. Golovlev, O.K. Lisnyak, and L.A. Gololveva. 1999. Isolation and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodnii* strain 135 and *Rhodococcus rhodochrous* strain 89: comparison with analogous enzyme of the ordinary and modified *ortho*-cleavage pathway. *Biochemistry* 64, 824-831.
- Strachan, P.D., A.A. Freer, and C.A. Fewson. 1998. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene. *Biochem.* 333, 741-750.

(Received April 24, 2002/Accepted June 12, 2002)

ABSTRACT: Characterization and N Terminal Amino Acid Sequence Analysis of Catechol 1,2-Dioxygenase from Benzoate Degrading *Acinetobacter* sp. KS-1

Seung-Youl, Song, Seung-II Kim¹, Kyung-Ha Yoon and Kye-Heon Oh* (Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-600, Korea, ¹Proteome Research Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Korea)

The purpose of this work was to investigate the characterization and sequence of catechol 1,2-dioxygenase (C1,2O) purified from *Acinetobacter* sp. KS-1 which was grown on benzoate as a sole carbon source. C1,2O demonstrated its enzyme activity to catechol and 4-methylcatechol. The optimum temperature of C1,2O was 35°C, and the optimal pH was in the range from pH 7.5 to 9.0. Ag⁺, Hg⁺, and Cu⁺² showed inhibitory effect on the activity of C1,2O. Molecular weight of the enzyme was determined to approximately 36 kDa by SDS-PAGE and N-terminal amino acid sequence of C1,2O was analyzed as ¹MNYQQIDALVKQMNVD²⁰TAKG and exhibited 95% sequence homology with that of C1,2O from *Acinetobacter radioresistens*. In addition, trypsin digestion and peptide mapping were performed for internal sequencing analysis. Molecular weights of three digested peptide fragments were analyzed as 966.3 Da, 1933.8 Da and 2081.7 Da by MALDI-TOF, which were matched with each internal sequences (¹SQSDFNLR⁹, ¹HGNRPSHVHYFVSAPGYR¹⁸, ¹TIEGPLYVAGAPES-VGFAR¹⁹) of *A. radioresistens*. PCR product was amplified with the degenerated primers derived from N-terminal and each internal amino acid sequences.