

## 슈도모나스가 생산하는 나프탈렌 DIOXYGENASE의 기질 특이성 및 결정체의 3차원 구조

이 경

창원대학교 미생물학과

인류 문명의 발달은 합성 화합물의 발달과 직선적 관계에 있다 하여도 과언이 아니다. 예를 들면, 새로이 합성된 유기 화합물은 우리가 하루하루 접하고 있는 일용품의 질과 양적 향상을 가져왔다. 세부적으로는 의약품의 개발로 인간 수명을 연장시켰으며, 농약 등의 개발로 식량 자원을 더욱 풍족하게 만들었다. 현재 약 십 만개 이상의 유기 화합물이 전세계적으로 생산되고 있으며, 그에 따라 수 백만 톤 이상의 유해 폐기물이 쏟아져 나오고 있다(1). 특히 석유 화합물로부터 유래된 방향족 화합물의 대량 생산 및 자연계의 노출은 그들의 독성 발암 물질의 성격으로 인해 생태계의 파괴 뿐 아니라 인류의 건강을 위협해 왔다. 이에 따라, 미생물에 의한 이들 화합물 분해에 지대한 관심을 갖는 것은 당연했다. 1968년 미생물의 벤젠 분해 효소계가 Gibson에 의해 처음 밝혀진 이후(2), 수많

은 미생물의 석유계 방향족 화합물 분해에 관한 연구가 진행되어 왔다. BTEX 화합물(벤젠, 톨루엔, 에틸 벤젠, 자일렌)과 다중 고리 방향족 화합물은 그 독성과 잔류성으로 인해 미생물 분해 연구의 대상이 되어 왔다. 호기적 조건에서 대부분의 경우, 이들 방향족 화합물 분해의 초기 반응에는 산소를 기질로 이용하는 aromatic ring dioxygenase가 관여하며, 이들은 cis-1,2-dihydroxylation 반응을 일으킨다. 또 이들 oxygenase는 2개의 전자를 이용하는 multicomponent계로 active site에 non-heme mononuclear iron( $Fe^{2+}$ )과 Rieske-type [2Fe-2S] redox center를 가지고 있다(아래 나프탈렌 dioxygenase 참조)(3). 지금까지 알려진 약 30여 종 이상의 이들 oxygenase는 다른 난분해성 또는 xenobiotic 화합물을 분해하는 첫 번째 효소로도 알려져 있다. 그 예들로는 세균에 의한 polychlorinated biphen-

Table 1. Chemicals degraded by bacteria containing aromatic ring dioxygenases\*

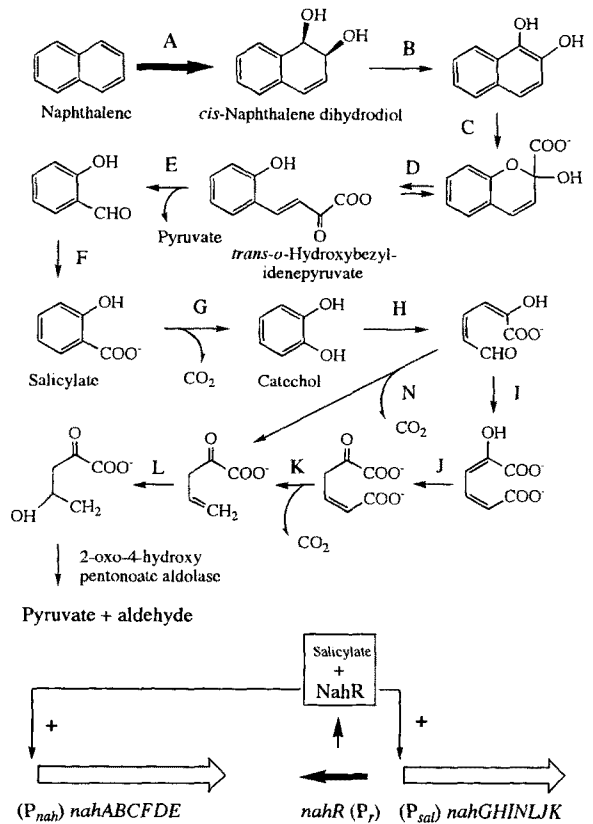
Aromatic Carboxylates	Ether-containing Aromatic Compounds
2-phthalate	dibenzofuran
benzoate	4-carboxyldiphenyl ether
4-cumate	
vanillate	Aromatic Hydrocarbons
2- and 3-toluate	benzene
2-halobenzoates	naphthalene
terephthalate	phenanthrene
4-methoxybenzoate	biphenyl
	toluene
S-containing Aromatic Compounds	styrene
4-sulfobenzoate	ethylbenzene
4-toluenesulfonate	propylbenzene
dibenzothiophene	
N-containing Aromatic Compounds	Cl-containing Aromatic Compounds
carbazole	3-chlorobenzoate
2-nitrotoluene	polychlorinated benzenes(PCBs)
2,4-dinitrotoluene	polychlorinated benzenes
aniline	
2-oxo-1,2-dihydroquinoline	Herbicides
	pyrazon
	4-chlorophenylacetate
	2,4,5-trichlorophenoxyacetate

\*This is an arbitrary classification, and some compounds can belong to the other groups.

ys(PCBs), polychlorinated 벤젠, 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (베트남 전 고엽제의 주요 성분), 그 외 염소, 질소와 황을 갖는 여러 다른 방향족 화합물의 분해가 되겠다(Table 1). 이와 같은 결과는 이들 효소 가족이 지구의 탄소 순환에 있어서 방향족 기를 갖는 자연산 또는 xenobiotic 물질을 순환시키는데 얼마나 중요한지를 보여주고 있다. 또 이들 oxygenase들은 대부분의 경우 넓은 기질 특이성을 보이며, 그 대사 산물은 독특한 chirality로 인해 stereochemistry가 복잡한 당 종류 등 생리 활성 물질의 전구체(chiral synthons)를 생산하는데도 이용되고 있다. 이 글에서는 이들 oxygenase의 대표가 되는 *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4가 생산하는 나프탈렌 dioxygenase의 생화학적 특성, 기질 특이성, 그리고 최근에 밝혀진 말단 oxygenase 성분의 결정체 3차원적 구조에 대해 언급하고자 한다.

### 나프탈렌의 미생물 대사

나프탈렌은 다중 고리 방향족 화합물의 가장 단순한 형태이며, 식물체에 의해서도 소량 생성이 되나 creosote나 원유 등에서 주로 발견이 된다. 나프탈렌은 자연계에서 쉽게 발견되며, 미국 환경청(EPA)이 정해 놓은 공해 물질(priority pollutant) 중의 하나이다. 미생물적 나프탈렌 분해 관심은 다중 고리 방향족 화합물, 예를 들면 benzo(a)pyrene 등이 발암 물질이라는 사실에서 출발했으며, 나프탈렌을 모델 화합물로 연구하기 시작했다. 미생물에 의한 나프탈렌의 분해 연구는 1927년으로 거슬러 올라가나, 대사 경로는 1964년 Davis와 Evans가 처음 연구하기 시작했다(4). 그 연구에 따르면 슈도모나스에 의한 나프탈렌의 가장 첫 분해 반응 산물은 동물의 cytochrome P-450 산화 효소의 반응 산물인 naphthalene oxide이며, 불완전한 그 생성물은 가수분해를 통해 trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene으로 전환될 것이라 하였다. 그러나 미생물 모델을 이용하여 다중 고리 방향족 화합물의 동물 발암성 기작을 연구하려 했던 Gibson 등은 슈도모나스의 나프탈렌 대사의 첫 산물은 trans 형태가 아닌 (+)-cis-(1R,2S)-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene(cis-naphthalene dihydrodiol)임을 밝혔다(5). 최근에 Eaton과 Chapman은 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase의 반응 산물은 Davis와 Evans가 제안한 cis 형태가 아닌 trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate라는 것을 밝혔다(6). 지금까지의 연구 결과를 토대로 *P. putida* G7의 나프탈렌 분해 경로는 Fig. 1과 같이 나타낼 수 있겠다. 나프탈렌 분해 경로에 관한 유전적 연구는 Gunsalus 그룹에 의해 시작되었으며, 약 83 Kb의 NAH plasmid 내에 나프탈렌 분해 경로의 효소들이 존재한다는 것을 밝혔다(7). 유전자의 mutation과 deletion을 통해 대사 경로를 보다 구체적으로 정립할 수 있었고, 유전 발현에 관한 연구도 이루어졌다. 나프탈렌 분해에 관련되는 유전자는 두개의 서로 다른 promoter에 의해 발현 조절되어지



**Fig. 1. (Top).** The naphthalene pathway in *Pseudomonas putida* G7. Enzymes involved are A, naphthalene dioxygenase; B, cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene dehydrogenase; C, 1,2-dihydronaphthalene dioxygenase; D, 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase; E, trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydroxylase-aldolase; F, salicylaldehyde dehydrogenase; G, salicylate hydrolase; H, catechol 2,3-dioxygenase; I, 2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase; J, 4-oxalocrotonate tautomerase; K, 4-oxalocrotonate decarboxylase; L, 2-oxopent-4-enate hydratase; N, 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase. **(Bottom).** A model of the regulation of *nah* gene operons. + symbols indicate induction by NahR in concert with the effector, salicylate. Adapted from references (6, 8).

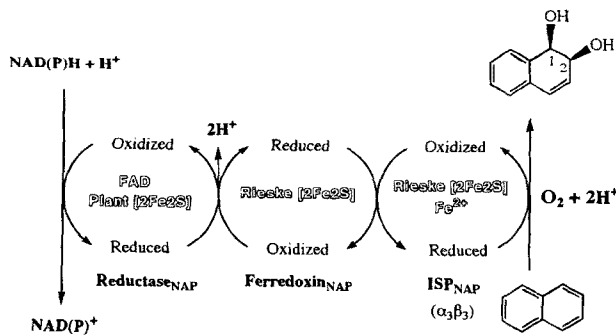
며, 그들은 *nah*와 *sal* operon이다. *nah* operon은 upper pathway인 *nahABCDEFDE* 유전자(나프탈렌에서 salicylate까지)를 조절하며, *sal* operon은 lower pathway인 *nahGHINLJK* 유전자(salicylate에서 2-oxo-4-hydroxypentanoate)를 조절한다(Fig. 1)(8). 각각의 promoter인  $P_{nah}$ 와  $P_{sal}$ 은 LysR 가족의 전사 활성체인 NahR이 salicylate와 결합할 때 발현되어진다(Fig. 1). 지금까지 무수히 많은 나프탈렌 분해 세균이 분리되었으며, 그들은 공통적으로 G7 균주에서 보여준 upper pathway를 이용하나, lower pathway가 다를 수 있다는 것이다(9). Lower pathway의 이용에 있어서, salicylate가 hydroxylation 반응을 통해 gentisate로 가는 경우가 있고, salicylate가 catechol로 전환이 되어

*ortho*(intradiol) 개환 반응을 통해  $\beta$ -ketoacid 경로로 거치거나, 위의 G7 균주에서처럼 *meta*(extradiol) 개환 반응을 통해 이용되는 경우가 있다. 이와 같은 대사 과정을 통해 미생물은 나프탈렌을 Krebs cycle의 중간체로 전환시켜 탄소원과 에너지원을 획득하게 된다.

### 나프탈렌 Dioxygenase

#### 생화학적 특성

위에서 언급한 G7 균주의 나프탈렌 dioxygenase와 같은 기능을 갖는 *Pseudomonas* sp NCIB 9816-4의 나프탈렌 dioxygenase는 Gibson 실험실에서 dioxygen fixation이라는 과제 하에서 주로 연구되어 왔다. 나프탈렌 dioxygenase는 3개의 서로 다른 단백질(Reductase<sub>NAP</sub>, Ferredoxin<sub>NAP</sub>과 ISP<sub>NAP</sub>)로 구성되어 있으며, 산소와 NAD(P)H를 이용하여 나프탈렌을 *cis*-naphthalene dihydrodiol로 전환시킨다(Fig. 1과 2)(10). 이들 단백질은 NAD(P)H의 두 전자를 효소의 active site에 전달시키기 때문에 redox center가 필요하다. 즉, NADH-oxidoreductase인 35.5 kDa Reductase<sub>NAP</sub>은 FAD와 plant(chloroplast)-type [2Fe-2S], 중간 전자 전달체인 11.5 kDa Ferredoxin<sub>NAP</sub>은 Rieske-type [2Fe-2S]를 포함하고 있으며, 그리고 두 개의 subunit(49.6 kDa  $\alpha$ 와 23 kDa  $\beta$ )로 구성된 말단 oxygenase인 ISP<sub>NAP</sub>의  $\alpha$  subunit에는 Rieske-type [2Fe-2S]와 nonheme mononuclear iron(Fe<sup>2+</sup>)이 있다. NAD(P)H의 두 전자가 Reductase<sub>NAP</sub>의 FAD와 [2Fe-2S], Ferredoxin<sub>NAP</sub>의 [2Fe-2S], ISP<sub>NAP</sub>의 [2Fe-2S]를 거쳐 mononuclear iron에 전달이 되며, [2Fe-2S] redox center의 두 iron 중에 하나의 iron만 +3과 +2의 산화 환원 상태를 보이기 때문에 나프탈렌 dioxygenase의 전체적인 전자 전달은 두 개의 전자가 동시에 전달되는 것이 아니라 하나의 전자가 두 번 전달된다는 것을 알 수 있다(Fig. 2). 그리고, 전자 전달을 받은 mononuclear iron에서 산소의 활성이 일어난다. Fig. 3



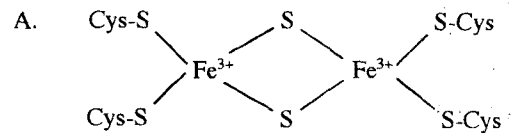
**Fig. 2.** Naphthalene dioxygenase showing the electron transport chain. In stoichiometry, oxidation of naphthalene to (+)-*cis*-(1R, 2S)-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene (*cis*-naphthalene dihydrodiol) requires NAD(P)H and molecular oxygen in an equal molar ratio.

생물산업

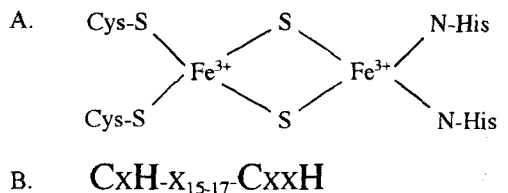
은 plant-type과 Rieske-type [2Fe-2S]의 아미노산 결합의 구조적 차이를 보여주는 것이며, 이들 차이는 EPR(electron paramagnetic resonance)의 연구 및 DNA의 염기 서열 결정에 의한 아미노산의 보존된 motif를 통해 구분 할 수 있다. 예를 들면, EPR 연구에서 환원된 plant-type과 Rieske-type [2Fe-2S]은 각각  $g_{av}$ -1.96과 ~1.91( $g_1=2.01$ ;  $g_2=1.92$ ;  $g_3=1.76$ )을 보이며(11), 각 [2Fe-2S]의 아미노산의 보존된 motif는 Fig. 3에 나와 있는 것과 같다(12). 지금까지 나프탈렌 dioxygenase는 각 단백질 수준에서 생화학적 연구는 많이 진행되어 왔으나, 이 dioxygenase가 산소를 어떻게 활성화시켜  $\pi$ -bond를 *cis*-형의 1,2-dihydrodiol로 만드는지, 또 어떤 형태의 단백질-단백질 상호작용에 의하여 전자가 전달되는지에 관한 연구는 보고되지 않고 있다.

지금까지 나프탈렌 dioxygenase와 유사한, active site에 Rieske-type [2Fe-2S]와 nonheme Fe<sup>2+</sup>를 갖는 oxygenase가 많이 보고되고 있다. 그들은 전자 전달에 관련된 단백질의 수, 각 단백질 내의 redox center의 종류 및 말단 oxygenase의 subunit 수에 따라 차이를 보인다. 이와 같은 차이를 Batie 등이 이 그룹 oxygenase의 분류에 도입하였으며, class IA, IB, IIA, IIB, III으로 분류하였다(13). Class IA는 두 단백질로 구성되어 있으며, NADH-oxidoreductase는 FMN과 plant-type [2Fe-2S]를 갖고, 말단 oxygenase는 ( $\alpha$ )<sub>n</sub>으로 구성되어 있다. 이 class의 대표는 슈도모나스의 phthalate 4,5-dioxygenase, vanillate O-demethylase, 4-methoxybenzoate O-demethylase 등이 해당된다. Class IB는 역시 두 단백질로 구성되어 있으며, NADH-oxidoreductase는 FAD와 plant-type [2Fe-2S]를 갖고, 말단 oxygenase는 ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>으로 구성되어 있다. 이 class의 대표는 *P. ar-*

#### Plant-type [2Fe-2S] redox center



#### Rieske-type [2Fe-2S] redox center



**Fig. 3.** Plant-type [2Fe-2S] and Rieske-type [2Fe-2S] redox centers (A) with their conserved coordinating amino acids (B). X is an amino acid.

*villa* C1, *Acinetobacter calcoaceticus*의 benzoate 1,2-dioxygenase와 *P. cepacia* AC1100의 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid oxygenase 등이 해당된다. Class IIA는 3개의 단백질로 구성되어 있으며, NADH-oxidoreductase는 FAD를, ferredoxin은 plant-type [2Fe-2S]를 갖고, 말단 oxygenase는 ( $\alpha\beta$ )n으로 구성되어 있다. 이 class의 대표는 슈도모나스의 pyrazon dioxygenase와 *Sphingomonas* sp. RW1 bezofuran 4,4a-dioxygenase 등이 해당된다. Class IIB도 3개의 단백질로 구성되어 있으며, NADH-oxidoreductase는 FAD를, ferredoxin은 Rieske-type [2Fe-2S]를 갖고, 말단 oxygenase는 ( $\alpha\beta$ )n으로 구성되어 있다. 이 class의 대표는 슈도모나스의 벤젠, 톨루엔, biphenyl dioxygenase 등이 해당된다. Class III도 3개의 단백질로 구성되어 있으며, NADH-oxidoreductase는 FAD와 Rieske-type [2Fe-2S]를, ferredoxin은 Rieske-type [2Fe-2S]를 갖고, 말단 oxygenase는 ( $\alpha\beta$ )n으로 구성되어 있다. 이 class의 대표는 위에서 언급한 슈도모나스의 나프탈렌 dioxygenase, 2-nitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene dioxygenase 등이 해당된다(각 oxygenase에 관한 참고 문헌은 NCBI[National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]의 PubMed를 통해 검색할 수 있음).

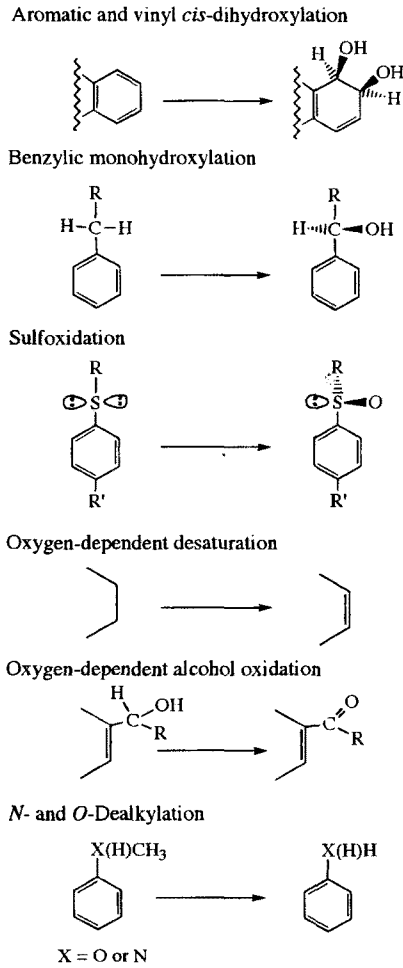
9816-4 균의 나프탈렌 dioxygenase의 유전자는 모두 대장균에 cloning되었으며, 각 유전자에 해당하는 염기 서열 Reductase<sub>NAP</sub>(*nahAa*), Ferredoxin<sub>NAP</sub>(*nahAb*)과 ISP<sub>NAP</sub>(*nahAcAd*)도 결정이 되어 있다(GenBank accession numbers M83950과 U49496). 위에서 언급한 NAH plasmid 내의 dioxygenase와는 아미노산 수준에서 각각 93, 93, 97과 95%의 동일성을 갖는 것으로 알려져 있다. NCBI의 BLAST 검색을 통해 조사한 결과에 의하면, 9816-4 균의 ISP<sub>NAP</sub>  $\alpha\beta$  subunit은 지금까지 밝혀진 다른 균에서 유래된 나프탈렌 dioxygenase와 93% 이상 동일한 아미노산을 갖는 것으로 밝혀졌다. 그 외 *P. putida* OUS 82의 polyaromatic hydrocarbon dioxygenase, *Pseudomonas* sp. JS42의 2-nitrotoluene dioxygenase, *Burkholderia* sp. DNT의 2,4-dinitrotoluene dioxygenase와 각각  $\alpha$  subunit에서 94, 84, 82%, 그리고  $\beta$  subunit에서 92, 76, 78% 동일한 아미노산을 갖는 것으로 나타나 있다.

### 기질 특이성

Aromatic ring dioxygenase의 기질 특이성에 관한 연구 역시 Gibson 실험실에서 많이 수행되어 왔으며, 초기에는 주로 톨루인을 *cis*-(1*S*,2*R*)-dihydroxy-3-methylcyclohexa-3,5-diene(*cis*-toluene dihydrodiol)으로 전환시키는 톨루엔 dioxygenase(14)에 관한 연구가 이루어 졌으나, 최근에는 biphenyl 및 나프탈렌 dioxygenase까지 연구 대상에 포함시키고 있다. 이 그룹 oxygenase의 기질 특이성에 관한 연구 목적은 크게 4 가지로 나눌 수 있다. 즉, 독특한 산소 화학을 수행하는 효소의 반응

기작을 연구하고, 유해 화합물의 무독성화를 통해 bioremediation 목적으로 사용하고자 하는 것과, 화학적으로 합성이 쉽지 않는 stereospecific하며 regiospecific한 *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodiol을 출발 물질로 생리 활성 물질을 합성하는데 이용하거나, 상업적 이용가치가 있는 화합물을 biotransformation 또는 bioconversion을 통해 과량 얻는 것이 되겠다. Aromatic ring dioxygenase의 기질 특이성에 관한 연구는 Wackett 등이 실험한 나프탈렌과 톨루엔 dioxygenase에 의한 indan의 산화 반응으로부터 시작되었다(15). 그 연구에 의하면, 두 oxygenase 모두 indan을 benzylic monooxygenation시키며, 톨루엔 dioxygenase는 (1*R*)-indanol을, 나프탈렌 dioxygenase는 (1*S*)-indanol을 각각 만들었다. 이 결과는 aromatic ring dioxygenase가 monooxygenation 반응을 한다는 것을 처음으로 보여 주었으며, 두 oxygenase에 의해 stereochemistry가 상반되는 반응 산물이 만들어짐을 보여 주었다. 나프탈렌 dioxygenase의 기질 특이성에 관한 연구는 최근의 review 논문에 발표되었다(10). 한 효소가 50개 이상의 서로 다른 화합물을 기질로 이용한다는 사실에 놀라지 않을 수 없다. 그리고, 나프탈렌 dioxygenase는 기질의 종류에 따라 dioxygenation(dihydroxylation), monooxygenation(monohydroxylation), desaturation, alcohol oxidation, sulfoxidation과 *N*-과 *O*-dealkylation 등의 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Fig. 4).

나프탈렌 dioxygenase의 기질을 대략 살펴보면, *cis*-dihydrodiol로 전환되는 기질들로는 나프탈렌, indene, 1,2-dihydronaphthalene, benzocyclohept-1-ene, biphenyl, anthracene, 9,10-dihydroanthracene, fluorene, phenanthrene, acenaphthylene, 9,10-dihydrophenanthrene, (1*R*)-indanol, 1-과 2-substituted naphthalene, 2-methoxynaphthalene, 2-naphthoic acid, 2,6-과 2,3-dimethylnaphthalene, 1-carbomethoxynaphthalene, dibenzo-1,4-dioxin, dibenzothiophene, dibezofuran 등이 있고, 비닐 그룹이 dihydrodiol로 전환되는 styrene이 있다. Monohydroxylation 반응의 기질로는 톨루엔, 에칠 벤젠, 자일렌, benzocyclobutene, indan, indene, 1-indanone, 2-indanone, (1*R*)-과 (1*S*)-indanol, fluorene, acenaphthene, acenaphthen-1-ol, 9,10-dihydrophenanthrene, acetophenone, nitrotoluenes, 1,2,4-trimethylbenzene, dimethylnaphthalenes, 3-methylbenzothiophene 등이 있다. Dehydrogenation 반응은 두 가지의 형태로 나타날 수 있으며, double bond가 만들어지는 desaturation과 알콜기가 산화되는 alcohol oxidation으로 구분된다. 특히 alcohol oxidation 반응의 경우, NAD<sup>+</sup>를 요구하지 않고 NAD(P)H와 산소를 요구한다는 측면에서 통상적으로 알려진 alcohol dehydrogenase와는 구분되어진다. Desaturation 반응의 기질로는 에칠 벤젠, indan, 1,2-dihydronaphthalene, phenetole, indoline, (1*R*)-과 (1*S*)-indanol 등이 되며, 이때 생성된 반응 산물들은 쉽게 dioxygenation 반응을 겪기 때문에 desaturation 반응 산물은 반응기 내에 과량



**Fig. 4.** Reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase. Adapted from reference (10).

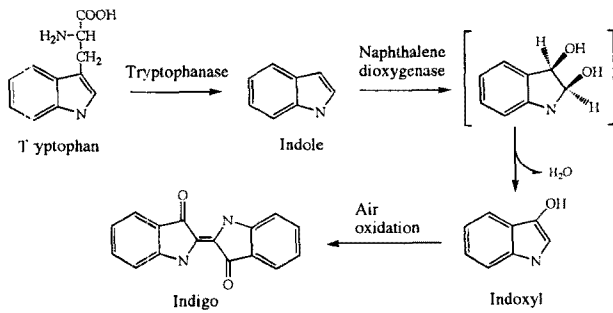
축적이 일어나지 않는다. Alcohol oxidation 반응의 기질로는 1-phenethyl alcohol, benzyl alcohol 등이 있다. 또, 나프탈렌 dioxygenase는 sulfide 기의 lone paired 전자를 monooxygenation 시키는 sulfoxidation 반응을 일으킨다. Sulfoxidation 반응의 기질로는 methyl phenyl sulfide, ethyl phenyl sulfide, methyl *p*-tolyl sulfide, *p*-methoxyphenyl methyl sulfide, methyl *p*-nitrophenyl sulfide, 2-methylbenzo-1,3-dithiole, 3-methylbezothiophene, dibenzothiophene 등이 있다. 나프탈렌 dioxygenase는 N과 O에 결합하고 있는 에틸기 또는 메틸기를 유리시키는 N-과 O-dealkylation 반응도 일으킨다. 그들의 기질로는 anisole, phenetole, N-methylindole, N-methylaniline과 N, N-dimethylaniline 등이 있다. 이상 나프탈렌 dioxygenase의 기질들을 알아보았는데, 위에서 보는 바와 같이 어떤 기질은 한 가지 이상의 반응 형태를 거치는 것을 알 수 있다. 예를 들면, 에칠 벤진의 경우, benzylic monooxygenation에 의해 생성된 1-phenethyl alcohol이 alcohol oxidation 반응을 거쳐 acetophenone이 되며, 이는 다시 monooxygenation을 거쳐 2-hydroxyacetophenone으로 된다. 또, 에칠 벤진은 desaturation 반응을 거쳐 styrene이 생성되며, 이 물질의 비닐기는 dioxygenation을 거쳐 1-phenyl-1,2-ethenediol이 된다(16, 17). 그리고 이와 같은 광범위한 기질 특이성에 관한 실험을 통해 얻을 수 있는 결론은 나프탈렌 dioxygenase는 반응 산물을 얻기 위하여 최소한 벤젠 만한 크기의 기질을 요구하며, benzylic monooxygenation에서는 pro-S의 hydrogen이 alcohol기로 바뀐다는 것이다. 이와 같은 stereochemistry의 선택은 sulfoxidation에서도 적용되는 것을 알 수 있다(Fig. 4). Monooxygenation 반응 산물의 경우, 순수한 enantiomer가 나올 때도 있으나, 대부분의 경우 S-enantiomer가 우세한 R과의 혼합물이 만들어진다.

**Indigo의 생산**

Aromatic ring dioxygenase가 생산하는 cyclohexadiene *cis*-dihydrodiol을 이용한 생리 활성 물질의 생산에 관한 연구는 이들 대사 산물이 노다지라고 주장하는 T. Hudlichy 실험실에서 많이 행해졌다(18). 톨루엔 dioxygenase가 만드는 halocyclohexadiene-*cis*-diol은 Diels-Alder 반응, epoxidation, photochemical oxygenation, metallation, diol cleavage, diene cleavage, carbene addition과 ozonolysis 반응을 쉽게 하며, 일련의 화학적 반응을 통해 종래 순수 화학적 합성이 쉽지 않았던 pseudosugars, nor-saccharides, inositols, conduritols, pinitols, prostanoic synthons, terpene synthons, (-)-zeylena와 (+)-lycoricidine 등으로 합성될 수 있었다. 또, 벤젠 dioxygenase가 생산하는 *cis*-benzene dihydrodiol을 이용하여 polymer인 polyphenylene도 합성할 수 있었다. 무엇보다도 나프탈렌 dioxygenase를 이용한 indigo의 생산이 aromatic ring dioxygenase의 상업적 이용에 가장 근접한 예로 간주되어 진다. Indigo는 천의 염색에 주로 사용되어지며, 나프탈렌 dioxygenase에 의한 indigo의 생산은 여러 많은 과학적 발견이 그러하듯 우연 이었다. 슈도모나스 균으로부터 나프탈렌 dioxygenase를 cloning 하던 중 나프탈렌 dioxygenase 유전자를 포함하는 대장균이 청색을 띠는 것을 알았다. 이것은 슈도모나스 균에는 존재하지 않는 대장균의 tryptophanase가 tryptophan을 indole로 바꿈으로써 생성된 indole이 나프탈렌 dioxygenase에 의해 dioxygenation 반응과 일련의 자발적인 반응을 거쳐 indigo로 전환되기 때문 이었다(Fig. 5)(19). 미국의 biotechnology 회사인 Genencor International사가 대장균의 genetically engineered metabolic transformations을 통해 포도당으로부터 indigo를 대량 생산 할 수 있는 기술을 개발하였다(20). 즉, 포도당에서 chorismate를 통해 tryptophan으로 가는 대장균 내의 대사 경로를 gene dosage를 증가시켜 보강하였고, 이 때 관련되는 조절 기작의 derepression 변이주를 사용하여 feedback 조절을 금지시켰으며, 최종 indole이 다시 tryptophan으로 전환되는 것을 막기 위하여

### Indigo의 생산

생물산업

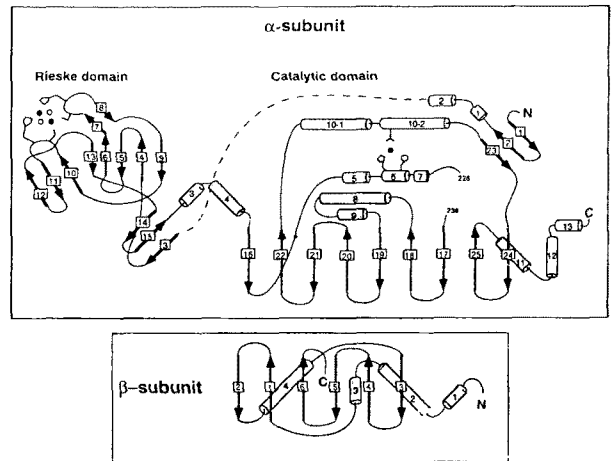


**Fig. 5.** Proposed pathway for indigo biosynthesis in a recombinant strain of *E. coli* containing naphthalene dioxygenase. [ ] indicates the intermediate which has not been identified. Adapted from reference (19).

tryptophan synthase의 돌연변이 균주를 사용하였다. 이와 같은 배경을 가진 대장균에 나프탈렌 dioxygenase를 cloning하여, 포도당으로부터 indigo를 대량 생산하였을 때, 처음 발생한 문제는 indole 생산의 중간체인 indoxyl이 발효조의 중성 pH에서 isatin으로 전환되어, 다시 indoxyl과 결합하여 청색의 질을 떨어뜨리는 빨간 색 indirubin이 부산물로 생성되는 것이었다. 이 문제를 해결하기 위하여, 토양에서 분리한 indole 분해 슈도모나스 균으로부터 isatin hydrolase 유전자를 다시 대장균에 cloning하여 isatin을 무해하며 색깔을 띠지 않는 isatic acid로 전환 시켰다. 최종 18 Kb의 15 ORF 유전자를 포함하는 대장균으로부터 3만 리터의 발효조를 시동하였을 때, 탄소의 수율이 12%이며 화학적 합성에 비해 질적인 면에서 뒤지지 않는 indole을 생산할 수 있었다고 한다(20). 단가 면에서는 화학적 합성과 유사하지만 화학적 합성(von Baeyer industrial synthesis)은 8개의 반응 단계를 요구하며, 환경 비친화적인 유해 부산물을 다량 생산하는 단점이 있다. 그래서, 나프탈렌 dioxygenase를 이용한 indigo의 생산은 미생물 biocatalysis를 이용한 "Green Chemistry"의 한 예가 된다고 볼 수 있다.

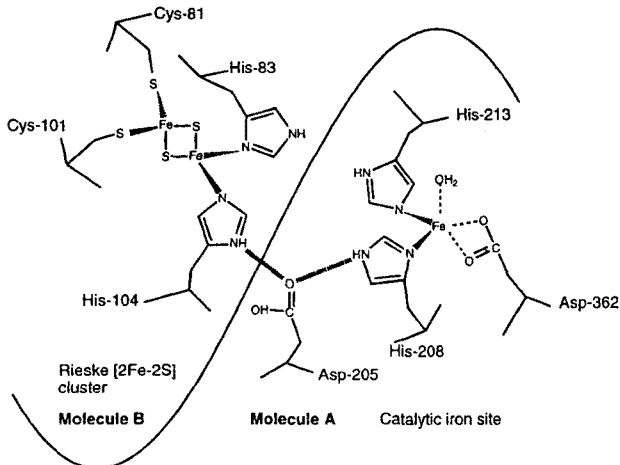
**Oxygenase 성분의 결정체 3차 구조**

Aromatic ring dioxygenase 가족 중에서 전자 전달에 관련되는 단백질의 결정체 3차 구조가 밝혀진 것은 있으나 기질 특이성을 결정하는 말단 oxygenase의 3차원적 구조는 밝혀진 바가 없다. 그러나, 최근 Gibson 실험실에서 본인이 만든 나프탈렌 dioxygenase의 oxygenase 성분인 ISP<sub>NAP</sub>의 결정체 구조가 결정되었기에 여기서 간략히 소개하고자 한다. 3차원적 구조 분석에 쓰인 결정체는 rhombohedral space group R32에 속하며, synchrotron 빛에 의하여 2.5Å까지 diffraction 되었다. 그리고, 구조 분석을 좀 더 쉽게 할 수 있었던 것은 단백질 내의 methionine 대신 selenomethionine이 100% 들어간 ISP<sub>NAP</sub>의 결정체를 만들어 MAD(multiple anomalous dispersion(MAD) data를 얻을 수 있었기 때문 이었다(21). 결정체의 3차원적 구



**Fig. 6.** A schematic drawing of the secondary structure elements of the ISP<sub>NAP</sub> in the α subunit (domains) and the β subunit (22).

조는 Sweden의 H. Eklund 실험실에서 분석하였다(22). 그 결과를 살펴보면, ISP<sub>NAP</sub>는 초기의 chromatographic 방법으로 결정된 α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>가 아니라 α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>의 분자구조를 가지며, 윗 부분의 α<sub>3</sub>과 아랫 부분의 β<sub>3</sub>이 함께 뭉친 벡서처럼 보인다(높이 75Å, 윗 둘레 102Å, 아랫 둘레 50Å). β subunit에는 하나의 긴 twisted 5 stranded mixed β-sheet이 주종을 이루며, active site가 존재하지 않는다(Fig. 6). α subunit에 가장 가까운 β subunit의 아미노산이 α subunit에 존재하는 active site와는 10Å 떨어져 있기 때문에, β subunit은 ISP<sub>NAP</sub> 구조의 안정화에만 관련이 되리라 추측하고 있다. α subunit은 25개의 β-strand와 13개의 α-helix로 구성되어 있으며, 두 개의 domain으로 나뉘어진다. 하나는 Rieske-type [2Fe-2S] redox cluster를 포함하는 Rieske domain이며, 구조를 유지하는 것은 4 개의 β-sheet(β-strands 3-15)이다(Fig. 6). β7과 β8 strand의 사이에 존재하는 loop의 Cys-81과 His-83이 Rieske-type [2Fe-2S]의 iron과 결합하고 있으며, β10과 β11 strand의 사이에 존재하는 loop의 Cys-101과 His-104가 Rieske-type [2Fe-2S]의 iron과 결합하고 있다(Fig. 6과 7). 이 domain은 최근에 밝혀진 cytochrome bc<sub>1</sub> complex의 Rieske-type [2Fe-2S] domain과 일치되는 것으로 보아, 둘은 같이 진화되어 왔음을 의미한다. 다른 하나는 mononuclear iron을 포함하는 catalytic domain으로 9개의 β-strand로 구성된 하나의 antiparallel β-sheet이 전체 domain의 구조를 유지해 나가며(Fig. 6), mononuclear iron은 His-208, His-213과 Asp-362에 의해 결합되어 있다(Fig. 7). 한 α subunit내의 Rieske [2Fe-2S] redox center와 mononuclear iron과의 거리는 43.5Å인 반면, 한 redox center가 다른 옆 α subunit의 redox center와의 거리는 12Å이기 때문에, 전자는 한 α subunit의 Rieske-type [2Fe-2S] redox center에서 옆에 붙어 있는 다른 α subunit의 mononuclear iron으로 전달될 것이라고 보고 있다



**Fig. 7.** The coordinations of Rieske-type [2Fe-2S] redox center and mononuclear iron. The catalytic iron site in Molecule A is connected to the neighboring Rieske [2Fe-2S] cluster in Molecule B through hydrogen bonds of Asp-205 (22).

(Fig. 7). Asp-205가 두 redox center를 수소 결합으로 연결하고 있다. Active site는 단백질 표면에서 15Å 내부에 존재하며, active site로 통하는 통로 및 mononuclear iron site 근처에 존재하는 hydrophobic 아미노산들이 나프탈렌 dioxygenase의 기질 특이성을 결정하는데 중요한 역할을 하리라 추측하고 있다.

## 결 언

이 글에서는 자연계에서 방향족 고리를 포함하는 화합물의 세균 분해 초기 반응에 관련되는, 그 한 대표가 되는 나프탈렌 dioxygenase의 생화학적 특성, 기질 특이성 및 최근에 밝혀진 말단 oxygenase 결정체 3차 구조에 대해 간략하게 살펴보았다. 지금까지 약 30여종 이상의 이 가족 oxygenase가 동정되었으며, 자연계에서 재순환되는 구조를 알 수 없는 수많은 방향족 화합물의 종류를 고려하면, 새로운 기질을 이용하는 이 계통의 oxygenase는 더 많이 분리되어지리라 본다. 이들 oxygenase는 특히 나프탈렌 dioxygenase에서 보았듯이 광범위한 기질 특이성과 다양한 반응 양상을 보이기 때문에, 자연계에 노출된 적이 없는 화합물도 기꺼이 분해시킬 수 있는 잠재력을 가졌다고 할 수 있다. 그래서, 여러 xenobiotic 화합물들이 이 가족의 oxygenase에 의하여 분해되어지는 것은 전혀 이상하지 않다. 앞으로, oxygenase 종류, 기질, 반응의 다양성(diversities of oxygenases, substrates and reaction types) 및 결정체 3차 구조 연구를 통해, 난분해성과 독성 방향족 화합물 분해를 위한 bioremediation과, 방향족 화합물의 원하는 위치에 hydroxylation을 통해 새로운 기능을 갖는 화합물로 전환시킬 수 있는 biocatalysis에 유용한 '인위 목적성 oxygenase'가 창출되기를 기대해 본다.

생물산업

## 참고문헌

- Swoboda-Colberg, N. G. 1995. In *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals* (Ed. Young, L. Y., and C. E. Cerniglia). pp. 27-74. New York, NY, Wiley-Liss, Inc.
- Gibson, D. T., J. R. Koch, and R. E. Kallio. 1968. *Biochemistry*, **7**, 2653.
- Mason, J. R. and R. Cammack. 1992. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 277.
- Davis, J. I. and W. C. Evans. 1964. *Biochem. J.*, **91**, 251.
- Jeffrey, A. M., H. J. C. Yeh, D. M. Jerina, T. R. Patel, J. F. Davey, and D. T. Gibson. 1975. *Biochemistry*, **14**, 575.
- Eaton, R. W. and P. J. Chapman. 1992. *J. Bacteriol.*, **174**, 7542.
- Yen, K. M. and G. S. Salus. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **15**, 874.
- Houghton, J. E. and M. S. Shanley. 1994. In *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals* (Ed. Chaudhry G. R.). pp. 11-32. Portland, Oregon, Dioscorides Press.
- Yen, K. M. and C. M. Serdar. 1988. *Crit. Rev. Microbiol.*, **15**, 247.
- Resnick, S. M., K. Lee, and D. T. Gibson. 1996. *J. Indust. Microbiol.*, **17**, 438.
- Gurbiel, R. J., C. J. Batie, M. Sivarala, A. E. True, J. A. Fee, B. M. Hoffman, and D. P. Ballou. 1989. *Biochemistry*, **28**, 4861.
- Neidle, E. L., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairock, M. Reikik, and S. Harayama. 1991. *J. Bacteriol.*, **173**, 5385.
- Batie, C. J., D. P. Ballou, and C. C. Corell. 1991. In *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (Ed. M. Ilier, F.), pp. 543-556. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioka, and T. J. Mabry. 1970. *Biochemistry*, **8**, 1626.
- Wackett, L. P., L. D. Kwart, and D. T. Gibson. 1988. *Biochemistry*, **27**, 1360.
- Lee, K. and D. T. Gibson. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3101.
- Lee, K. 1997. Proceedings of the international symposium and 1997 spring meeting of the Korean society for applied microbiology, Seoul. pp. 178-186.
- Brown, S. M. and T. Hudlicky. 1993. In *Organic synthesis: theory and applications* (Ed. Hudlicky, T.), pp. 113-176. Greenwich, CT, JAI Press.
- Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Ossland, M. J. Simon, L. P. Wackett, and D. T. Gibson. 1983. *Science*, **222**, 167.
- Bialy, H. 1997. *Nature Biotech.*, **15**, 110.
- Lee, K., B. Kauppi, R. E. Parales, D. T. Gibson, and S. Ramaswamy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press.
- Kauppi, B., K. Lee, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. submitted.