

신경작용제 분해효소의 Soman 및 Sarin Gas 분해 능력 측정 및 제독응용 가능성

Test of Degradation of Soman and Sarin Gas by Organophosphorus Acid Anhydrolase and Applicability of the Enzyme to the Development of Nerve Agent Decontaminant

김 석 찬* 이 남 택**
Kim, Seok-Chan, Lee, Nam-Taek

ABSTRACT

A gene expressing organophosphorus acid (OPA) anhydrolases have been cloned from *Alteromonas haloplanktis* strain and expressed in bacterial strain BL21. Crude extract was prepared from the transformed bacterial strain BL21 and used in testing its degrading capability of real nerve gas, soman and sarin. Within 1 minute after the start of the reaction, nearly 65% of the soman added to the reactant(3mM) was degraded by adding 1 mg of the crude extract enzyme(20.0 Unit mg⁻¹ crude protein). In 6 minutes, the reaction reached at its steady state, which indicates that soman was completely degraded by that time. In the case of sarin, the degradation efficiency was observed to be about 0.7 times of that of soman. If the specific activity of OPAA is enhanced by both increased expression efficiency and purification, OPAA seems to be applied for the development of decontaminant of skin, especially of eye.

Key Word : organophosphorus acid (OPA) anhydrolases

1. 서 론

신경작용제는 콜린작용기전(cholinergic mechanism)을 군사적 목적으로 이용하기 위해 설계된 화학물질이다. 이 작용제는 신경세포의 시냅스 틈(synaptic cleft) 안으로 침투하여 acetylcholinesterase(AChE)의 활성부위에 있는 serine 잔기와 비가역적으로 결합하므로써 AChE

의 ACh 가수분해 기능을 억제시킨다.⁽¹⁾ 이 결과 중추 신경 및 말초신경계의 시냅스 틈에 ACh가 과도하게 축적되어 지속적인 콜린효과(choline effect)를 나타낸다.

군사적으로 사용되는 G 계열 신경작용제에는 tabun (GA), sarin(GB) 및 soman(GD) 등이 있는데, 이들 OP 화합물(organophosphorus compounds)은 화학전에 사용될 때 인체에 독성을 미칠뿐만 아니라 전투장비도 오염시켜 전투력에 큰 손실을 준다.

현재 미군에서는 신경작용제에 오염된 장비를 제독

* 군사과학대학원 재료과학과 석사과정

**육군사관학교 화학과 교수

하기 위하여 DS2 제독제(2% NaOH, 28% ethylene glycol monoethylether, 70% diethylenetriamine)를 사용하고 있다. 이 제독제는 비록 제독효과가 좋지만, 피부 접촉시 인체에 미치는 독성효과가 크고(quite toxic), 취급시 마스크, 보호안경 및 보호장갑을 착용해야 할뿐만 아니라, 가연성이고(flammable), 부식성도 커서(corrosive), 자연환경을 파괴하는 단점이 있다.⁽²⁾ 또한 신경작용제에 오염된 피부를 제독하기 위하여 M13 제독 kit를 사용하지만 역시 발암성 물질이기 때문에 사용상 부작용이 커서 현재 이들 제독제에 대한 대체제가 절실히 요구되고 있는 실정이다.

이러한 필요성에 의거 미 ERDEC 산하 화생방 연구소에서는 독성 및 부작용이 전혀 없는 효소가 작용제에 오염된 피부 및 장비를 제독하는데 아주 이상적이라고 추천하면서, 1993년부터 현재까지 효소를 이용한 제독제 연구에 박차를 가하고 있다.⁽³⁾

유기인산 화합물을 분해시키는 대표적인 3가지 형태의 효소는 다음과 같다.

첫 번째 효소는 organophosphorus acid hydrolase(OPH), 또는 phosphotriesterase라 불리는데, 이 효소는 *Pseudomonas diminuta* MG와 *Flavobacterium* sp. strain (ATCC 27551)으로부터 발견되었다.^(4,7) 이 두 종류의 박테리아로부터 발견된 효소는 paraoxon, DFP, soman, sarin, tabun 등을 분해할수 있으며, 유전자 염기순서를 분석한 결과 유전자로 밝혀졌다.⁽⁸⁾

두 번째 효소는 organophosphorus acid (OPA) anhydrolase, 일명 OPAA-2라 불리는데, 이 효소는 *Alteromonas* sp. strain JD6.5로부터 발견되었다.⁽⁹⁾ 이 효소도 OPH와 마찬가지로 paraoxon, DFP, soman, sarin, tabun을 다같이 분해시킬 수 있다. 그러나 OPAA-2는 OPH보다 soman 분해능력이 더 큰 반면, OPH는 OPAA-2 보다 paraoxon 분해능력이 더 크다.^(9,10,11) 1996년, ERDEC에서는 유전자 조작을 통하여 박테리아로부터 이 효소를 대량 획득하고, 분말형태의 효소로서 야전실용화를 위한 다양한 실험을 한 결과 매우 고무적인 결과를 얻었다.⁽¹²⁾

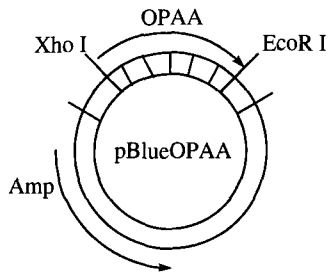
세 번째 효소는 *Alteromonas undina*와⁽¹³⁾ *Alteromonas haloplanktis* C 로부터⁽¹⁴⁾ 발견된 OPA anhydrolase 인데, 이들 효소는 유사한 성질을 가지고 있으며, DFP 및 sarin(GB), soman(GD), 그리고 GF까지 광범위한 분해능력을 가지고 있을 뿐만 아니라, 효소의 활성(activity)도 매우 높아서 군사적으로 매우 유용하게 응용될 전망이다.^(9,13,14,15) *Alteromonas haloplanktis* C (ATCC 23821) 로부터 발견된 OPAA 효소는 원래 proline 잔기가 carboxyl-terminal 쪽에 위치한 dipeptide, 즉 X-Pro의 peptide bond를 가수분해하는 활성을 가진 prolidase로 알려져 왔다.⁽¹⁶⁾ 그런데 최근 prolidase가 X-Pro의 peptide 결합을 가수분해할 뿐만 아니라 DFP를 비롯해서 G-계열 신경작용제의 P-F 결합도 가수분해할 수 있는 기능을 가지고 있다고 보고되어 prolidase는 일명, 유기인가수분해 효소(organophosphorus acid anhydrolase : OPAA)라고도 불리고 있다. 일반적으로 G-계열의 작용제의 P-F 결합이 가수분해되면 작용제의 독성효과가 사라지기 때문에 prolidase는 G-계열작용제의 제독제로서 응용될 가능성이 있어서 효소제독제 연구에 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구팀에서는 OPAA 유전자를 *Alteromonas haloplanktis* C 박테리아로부터 클로닝하여 plasmid DNA, pBlue OPAA를 유전자 재조합 한 바 있다.⁽¹⁷⁾ 그리고 이 plasmid DNA를 이용하여 단백질을 발현시킨 후, 유사 신경작용제인 DFP의 분해능력을 측정하였다.⁽¹⁷⁾ 금번 연구에서는 동일한 OPAA 효소로서 실작용제인 soman 및 sarin에 대한 분해능력을 측정하여 유사작용제인 DFP 분해능력과 비교하였으며, 이를 토대로 이 효소의 신경작용제 제독제로서의 응용 가능성에 대하여 분석하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 OPAA 효소의 발현

OPAA 효소 획득을 위하여 pBlue OPAA plasmid



(그림 1) pBlue OPAA plasmid DNA

DNA를 이용하였다(그림 1).

pBlue OPAA plasmid DNA는 본 연구팀에서 개발한 OPAA 발현 plasmid DNA로서 BL21 박테리아에서 발현 효율이 매우 높으며, 발현된 OPAA 효소의 크기 및 그리고 DFP 분해능력이 측정된 바가 있다.⁽¹⁷⁾

pBlue OPAA는 pBluescript SK(-)에 OPAA 유전자를 재조합시킨 recombinant plasmid DNA로서, promoter, structural gene, 그리고 flanking region을 포함하여 총 1,354 bp의 본래 OPAA 유전자 절편을 가지고 있으며, 이 중 structural gene의 길이는 1,320 bp로서 440 개의 아미노산으로 구성되어 있다. 또한 pBluescriptSK(-) plasmid DNA vector는 LacZ promoter 및 selection marker로서 ampicilin resistant gene을 가지고 있다. OPAA 효소의 발현을 위하여 pBlue OPAA plasmid DNA로써 BL21 박테리아를 형질변형 시켰다. 그리고 이 형질변형된 BL21박테리아로부터 OPAA를 발현시키기 위하여 1 mM IPTG를 함유한 37°C, LB 배지에서 18~24 시간동안 배양하였다. 사용한 배지는 LB medium 이다(10g tryptone, 5g yeast extract 10g NaCl).

2.2 OPAA 효소의 추출

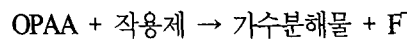
배양한 박테리아를 원심분리기를 이용하여 침전시킨 후(Soval, 5,000rpm, 10분), 효소추출용액(50mM (NH₄)₂CO₃ (pH 7.5), 0.1mM MnCl₂, 10mM의 β-mercap-

toethanol)으로 2 차례 씻었다. 박테리아 pellet 1g당(wet cell) 3ml의 추출용액으로 희석한 후, 일련의 물리적인 방법으로 박테리아를 연속 3회 반복하여 파쇄한 후(freeze/thaw, French pressure, 및 sonication), 원심분리기를 이용하여(Sorval, 12,000rpm, 20분) 파쇄된 박테리아 용액으로부터 crude extract를 추출하였다.

OPAA 효소의 activity는 추출용액의 상층(aqueous supernatant)에서 발견되었다.

2.3 OPAA 효소의 작용제 분해능력 측정(assay)

OPAA 효소의 가수분해 활성은 효소에 의하여 DFP, GB(sarin) 및 GD (soman)이 가수분해 될때 방출되어 나오는 F⁻ 이온의 농도를 F⁻ 이온농도 측정전극을 이용하여 측정하였다.⁽¹²⁾



Assay를 위한 각 반응용액은 3mM의 작용제(DFP, sarin 또는 soman : 50mM stock solution in isopropanol)와 1mg의 crude enzyme을 함유하고 있으며, 사용한 완충용액은 AM buffer(50mM (NH₄)₂CO₃(pH 7.5), 0.1mM MnCl₂, 10mM β-mercaptoethanol), 3mM의 DFP, sarin, soman(in isopropanol)이다.

반응용액의 최종 용량은 10ml이며, 반응은 37°C에서, stirring bar로 부드럽게 저어주면서 실시하였다. 사용한 이온전극 측정기는 미국, Orion 회사 제품이며, F⁻이온 농도 측정 단위는 ppm이다. F⁻이온의 측정치, 19ppm은 1mM F⁻이온 농도에 해당한다. 본 연구에서 사용한 crude enzyme의 효소 활동도(activity) 1Unit은 분당 1.0μmole의 F⁻이온이 분해되는 양으로 (1Unit=1.0μmole F⁻ · min⁻¹) 정했으며, specific activity는 효소 1mg 당 분해되는 F⁻이온의 농도로서 (U mg⁻¹) 정했다.

3. 결과 및 고찰

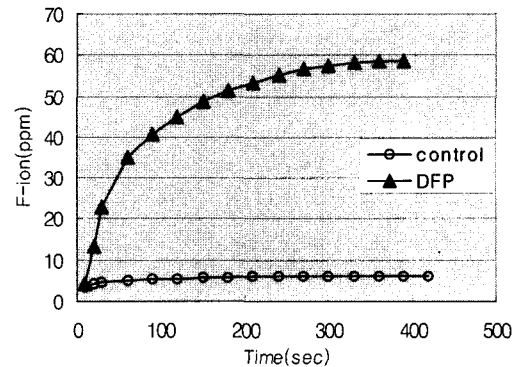
3.1 OPAA에 의한 DFP의 가수분해

발현된 OPAA 효소에 의하여 DFP 분해시 생성되는 F⁻ 이온의 농도를 시간의 변화에 따라 측정하였다 (표 1 및 그림 2).

반응용액의 DFP 농도는 3mM이며, 1mg의 crude enzyme을 사용하였다. 반응 결과 약 6분 후, 반응이 정상상태에 도달했고, 이때의 F⁻ 이온의 농도는 약 58.5ppm 이다. 이 값은 반응용액 안의 3mM DFP가 모두 분해될 때 나타나는 F⁻ 이온 농도의 값과 일치한다.

(표 1) DFP 분해에 따른 F⁻ 이온 농도

시간(초)	control	DFP
10	3.39	4.12
20	4.03	13.5
30	4.59	22.7
60	4.93	34.9
90	5.18	40.7
120	5.33	44.8
150	5.66	48.7
180	5.83	51.5
210	5.92	53.1
240	5.96	55.2
270	6.03	56.7
300	6.05	57.3
330	6.1	58.2
360	6.12	58.5
390	6.17	58.7
420	6.19	



(그림 2) DFP 분해에 따른 F⁻ 이온 농도

즉, 약 반응시작 6분 후 용액 안의 모든 DFP가 완전히 분해되었음을 의미한다. 반응시작 1분 후의 F⁻ 이온 농도는 34.9ppm이었다. 이는 반응시작 1분내에 전체 DFP 양의 60%가 분해되었음을 의미하며, 34.9ppm은 1,837 μM에 해당하며, 이는 18.4 μmole F⁻ · min⁻¹ · mg⁻¹ protein, 즉, 18.4 Umg⁻¹ protein 이다.

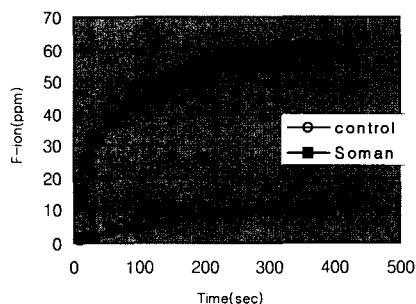
3.2 OPAA에 의한 soman의 가수분해

발현된 OPAA 효소로 soman 분해시 생성되는 F⁻ 이온의 농도 역시 시간의 변화에 따라 측정하였다(표 2 및 그림 3).

반응용액 중의 soman 농도는 3mM이며, 1mg의 crude enzyme을 사용하였다. 반응 결과 DFP 분해와 마찬가지로 약 6분 후 반응이 정상상태에 도달했고, 이때의 F⁻ 이온의 농도는 약 59.8ppm 였다(soman의 농도가 3mM 일때, F⁻ 이온의 최고 ppm 값은 이론적으로 57 ppm이나, 반응에 사용된 soman의 농도가 약 3.1mM 정도 인듯 함). 이 값 역시 반응용액 안의 soman이 모두 분해될 때 나타나는 F⁻ 이온 농도의 값과 일치하는 값으로, 반응시작 약 6분 후 용액 안의 모든 soman이 완전히 분해되었음을 의미한다. 반응시작 1분 후의 F⁻ 이온 농도는 39.0ppm 이었는데, 이는 반응시작 1분내에

(표 2) Soman 분해에 따른 F⁻ 이온 농도(ppm)

시간(초)	control	Soman
10	1.21	15
20	1.89	25.3
30	2.11	32
60	3.82	39
90	5.01	43.8
120	5.93	47.3
150	6.82	50.2
180	7.56	52.9
210	8.26	54.9
240	8.99	56.5
270	9.65	57.8
300	10.3	58.8
330	10.4	59.7
360	10.5	59.8
390	10.8	59.8
420		



(그림 3) Soman 분해에 따른 F⁻ 이온 농도(ppm)

전체 soman의 65%가 분해되었음을 의미하며, DFP 분해속도보다 약간 빠르다(그림 4). 반응시작 1분 후의 분해되는 soman의 양을 환산하면 2,052 μM에 해당하며, 이는 20.5 μmole F⁻ · min⁻¹ · mg⁻¹ protein, 즉, 20.5 Umg⁻¹protein 이다.

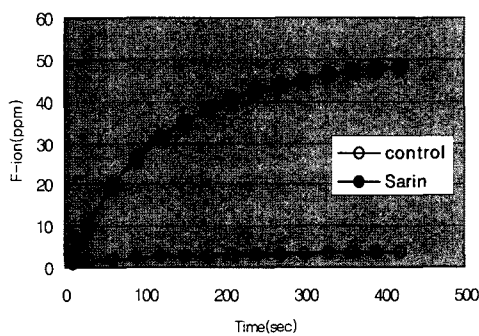
3.3 OPAA에 의한 sarin의 가수분해

sarin의 분해속도를 F⁻ 이온 농도 전극을 이용하여 시간의 변화에 따라 측정하였다(표 3 및 그림 4).

sarin의 분해속도 측정 역시, DFP 및 soman의 측정 시와 동일한 조건하에서 실시하였다. 반응시작 1분 경과 후 분해된 F⁻ 이온의 농도는 19.7ppm이었다.

(표 3) sarin 분해에 따른 F⁻ 이온 농도(ppm)

시간(초)	control	Sarin
10	1.02	2.1
20	1.26	5.93
30	1.48	10.2
60	1.94	19.7
90	2.29	26.3
120	2.52	31
150	2.72	35
180	2.88	37.8
210	3.04	40.4
240	3.12	42.4
270	3.27	44
300	3.38	45.1
330	3.46	46.1
360	3.56	47
390	3.65	47.5
420	3.74	48.1

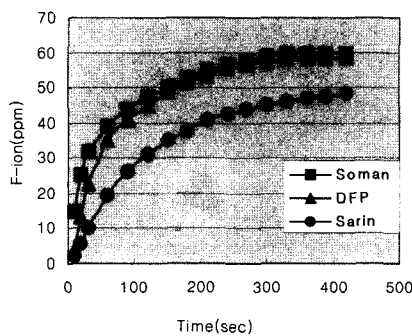


(그림 4) sarin 분해에 따른 F⁻ 이온 농도(ppm)

3.4 DFP, soman 및 sarin의 비교

기질의 농도와 효소의 양이 동일한 조건하에서 DFP, soman 및 sarin의 분해속도를 비교해 보았다(그림 5).

DFP와 soman의 경우, 반응시작 6분 후, 반응용액 중의 모든 기질이 분해되어 정상상태에 이르렀지만 sarin은 그렇지 못하다. 즉, DFP 및 soman이 sarin 보다 훨씬 빠르게 분해된다. 반응시작 1분 후의 분해된 정도를 비교할 때, soman으로부터 분해된 F⁻ 이온농도는 39ppm, 그리고 DFP로부터 분해된 F⁻ 이온농도는 34.9 ppm 이다. DFP 보다 soman의 초기 분해속도가 더 빠르다는 것을 의미한다.



(그림 5) DFP, soman 및 sarin의 분해비교

3.5 OPAA 효소의 피부제독제 응용 가능성

본 연구에서 *Alteromonas haloplanktis*로부터 클로닝한 유전자(pBlue OPAA)로 부터 단백질을 발현시켜 DFP의 분해능력을 측정된 결과 crude extract의 specific activity가 20 U/mg에 불과했다. 그러나 Tu-Chen Cheng 팀에서 *Alteromonas sp. strain JD6.5*로부터 클로닝한 유전자로부터 발현시켜 추출한 crude extract(OPAA-2)의 specific activity 역시 15U/mg 에 불과했다.⁽¹⁶⁾ 그러나 유전자 재조합을 통하여 획득한 단백질의 발현효율

등을 개선한 결과 정제된 OPAA-2의 specific activity를 1,820U/mg까지 높힐 수 있었다.⁽¹⁸⁾

만약 pBlue OPAA의 발현효율을 높이고 정제된 OPAA 효소의 specific activity가 1,800U/mg 정도가 된다면, 이 효소는 Tu-Chen Cheng 팀에서 개발한 OPAA-2와 함께 신경작용제에 오염된 피부제독제 개발에 응용이 가능할 듯하다.

예를 들면 200mm 방사포로 GD 탄을 살포할 경우, 최대오염농도는 1.28g/m² 이다.(GD 탄 1발의 살포면적; 85×90m², 1발 충전량; 9.8kg/발). 그리고 1인당 최대 체표면적을 2m²로 가정할 경우, 1인 최대 오염농도는 약 2.5g GD/명을 예상할 수 있다. 그런데 OPAA의 specific activity가 1,800U/mg 일 경우, 효소 1mg 으로써 반응시작 1분 이내에 분해시킬 수 있는 soman의 양은 약 0.33g GD 이다. 그러므로 정제된 효소 7-8mg 으로 오염된 1명을 충분히 제독시킬 수 있다는 계산이 나온다. 그러나 실제로는 살포된 작용제가 공기 중에서 빠르게 확산이 되므로 아주 심하게 오염된 경우를 제외하고 실제 1인 오염농도는 이론치의 0.001배 정도 밖에 되지 않을 것으로 예상된다. 특히 안구가 오염되었을 경우, M13 제독제를 눈에 사용할 수가 없다. 그러므로 안약 형태로 OPAA 및 OPAA-2 효소를 제독제로 사용한다면 큰 부작용이 없이 제독효과를 볼 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구는 효소제독제 개발을 위한 기초 연구로서 crude OPAA extract를 사용하여 실작용제인 soman 및 sarin의 가수분해 활성을 측정하였다. 비록 crude extract의 specific activity 값이 낮지만 재조합된 유전자의 발현효율을 높이고, 효소를 정제할 경우, 피부에 오염된 신경작용제를 제독하는데 응용이 될 수 있을 정도의 OPAA specific activity 값을 얻을 수 있다고 판단된다.

효소는 피부 제독 중에서도 특히 눈에 오염된 작용제를 제독하는데 바람직할 것으로 판단되어, 향후 OPAA의 작용제 분해활성(degrading activity)이 더 높은 유전자의 획득 및 효소의 발현효율(expression efficiency)의 제고에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Koelle, G. B. 1975, Anticholinesteraseagents. In "The Pharmacological basic of Therapeutics" (L.S. Goodman and A. Gilman. eds), 5th Ed., p. 445. Macmilan, New York.
2. Richardson, G. A., 1972; 야전교범 3-40.
3. Lin Liu, 1997, in press(미국방백서: 'Recommendations for the Disposal of Chemical Agents and Munition' 편, 1994).
4. 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.
5. 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. Bacteriol.* 170, 2306-2311.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. DeFrank, J. J., beudry, W. T., Cheng, T-C., Harvey, S. P., Stroup, A. N., and SzafranceI. I. 1993. Screening of halopholic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem. Biol. Interact.* 87, 141-148.
10. 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 diisopropylfluoro-phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 685-1689.
11. 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.
12. Cheng, T-C. and Calomiris, J. J. 1996. A cloned bacterial enzyme for nerve agent decontamination. *Enzyme and Microbiol. Tech.* 18. 597-601.
13. 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.
14. 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. p. 12, In international workshop on biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. U.S. Army, ERDEC, Averdeen Proving

- Ground, MD.
15. DeFrank, J. J. and Cheng, T-C. 1991, Purification and properties of anorganophosphorus acid anhydrolase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* 173, 1938-1943.
 16. Cheng, T-C., Harvey, S. P. and Chen, G. 1996. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl. Environ, Microbiol.* 62, 1636-1641.
 17. 이남택, 박재왕, 김석찬. 1998. expression of a gene encoding an enzyme for degradation of organophosphorus nerve agents, 한국군사과학기술학회.
 18. 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.