

*Delftia acidovorans*로부터 Aniline 분해관련 유전자의 분리

김현주 · 김성은¹ · 김정건² · 김진철 · 최경자 · 김흥태³ · 황인규² · 김흥기¹ · 조광연 · 이선우*
한국화학연구원 생물화학부, ¹충남대학교 농생물학과, ²서울대학교 응용생물화학부, ³충북대학교 농생물학과

Cloning Genes Involved in Aniline Degradation from *Delftia acidovorans*. Kim, Hyun-Ju, Sung Eun Kim¹, Jung-Gun Kim², Jin-Cheol Kim, Gyung Ja Choi, Heung Tae Kim³, Ingyu Hwang², Hong Gi Kim¹, Kwang Yun Cho, and Seon-Woo Lee*. *Bio-Organic Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea, ¹Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, ²School of Applied Biology and Chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, ³Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea* – *Delftia acidovorans* 51-A isolated from river water degrades aniline. In order to clone genes involved in aniline degradation, transposon Tn5-B20 was inserted into the strain 51-A to generate a mutant strain 10-4-2 that cannot utilize aniline as a carbon source. The mutant strain was not an auxotroph but could not degrade aniline. Southern hybridization analysis indicated that the transposon was inserted into the mutant bacterial DNA as a single copy. Flanking DNA fragment of Tn5-B20 insertion was cloned and sequenced. DNA sequence analysis revealed three ORFs encoding TdnQ, TdnT, and TdnA1 that are responsible for catechol formation from aniline through oxidative deamination. The analysis also confirmed that Tn5-B20 was inserted at the immediate downstream of *tdnA1*. The result suggests that the transposon insertion behind *tdnA1* disrupted the pathway of the catechol formation from aniline, resulting in the mutant phenotype, which cannot degrade aniline. A large plasmid over 100-kb in size was detected from *D. acidovorans* 51-A and Southern hybridization analysis with Tn5-B20 probe showed that the transposon was inserted on the plasmid named pTDN51. Our results indicated that the *tdn* genes on pTDN51 of *D. acidovorans* 51-A are involved in aniline degradation.

Key words: Aniline, *Delftia acidovorans*, *tdn*, pTDN51

다양한 산업부산물의 자연환경으로 유출은 지하수, 하천, 토양 등의 오염을 유발하여 인류의 보건과 자연생태계를 위협하고 있다. 이들 중 방향족 아민들은 염색약, 의약품, 플라스틱, 제초제 등의 제조에 광범위하게 이용되는데 특히 아닐린과 그 치환체들(클로로아닐린, 메틸아닐린)은 독성이 있고 토양에서 제초제 대사의 주 산물로 검출되고 있다[2, 8, 10]. 이들은 환경에 유출되어 각종 발암효과가 있고 돌연변이 유발 가능성이 있는 것으로 알려져 있어서 오염된 지하수, 하천, 토양에서 아닐린 및 그 치환체들의 제거가 중요한 환경문제이다[4, 23].

아닐린 및 그 치환체들의 환경에서, 특히 수서환경에서, 주 분해 경로는 생물학적 분해(biodegradation)로 알려져 있다[15]. 이 과정은 주로 미생물에 의해 호기적인 환경과 혐기적인 환경에서 서로 다른 과정을 거쳐서 분해가 되는 것으로 알려져 있다. 호기적인 분해의 첫 단계는 산화적인 deamination에 의한 catechol의 형성이 되고 연속적인 미생

물의 대사로 *ortho*-cleavage 경로 또는 *meta*-cleavage 경로를 통해 최종 무기화 되는 것이다[1, 13, 14, 27]. 혐기적인 아닐린 분해의 경로는 *Desulfobacterium anilini*에서 발견되었는데 먼저 아닐린이 carboxylation 되어 4-aminobenzoate가 형성되고 이후 환원적 deamination에 의해 분해가 되는 것으로 알려져 있다[20]. 호기적인 분해에서 아닐린으로부터 catechol이 형성되는 과정에 관련되었을 것으로 추정되는 유전자들이 최근 *Pseudomonas putida* mt-2에서 분리된 pTDN1에 존재하며 이들 유전자들이 아닐린 분해에 필요하다는 것을 *P. putida* UCC22를 이용하여 증명하였다[6]. 아닐린 분해에 관련된 유전자들은 플라스미드에서 두개의 direct repeat에 둘러싸인 26-kb DNA 조각에 위치해 있어서 미생물간의 아닐린 분해 유전자들의 이동이 가능할 것으로 여겨진다. 한편 아닐린을 분해하는 *Acinetobacter* sp. 균주 YAA로부터 아닐린 산화효소를 생산하는 *atdA* 유전자가 보고되었는데 이는 pTDN1의 *tdnA1*과 유사한 아닐린 dioxygenase의 large subunit과 같은 기능을 하는 유전자로 보고되었다[5, 24].

Fukumori 등이[6] 제안한 아닐린의 catechol로 전환의 가상적인 경로는 다음의 몇 단계로 이루어져 있다. 먼저 *tdnA1*과 *tdnA2*의 산물인 아닐린 dioxygenase가 아닐린의 1, 2번

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-7086, Fax. 82-42-861-4913
E-mail: seonlee@kriect.re.kr

탄소에 산소를 첨가하여 diol이 형성되며 1번 탄소의 아미노 그룹은 *tdnQ* 산물 단백질로 전이되며 *tdnT* 유전자 산물에 의해 다른 기질이나 화합물로 아미노 그룹이 전이되어 아닐린이 catechol로 전환된다고 여겨진다. 유전자 *tdnA2*의 downstream 쪽으로 *tdnB*와 *tdnR*이 발견되는데 *tdnB*는 reductase와 유사하며 *tdnR*의 산물은 *tdn* operon의 발현을 양성적으로 조절하는 LysR 유형의 response regulator로 보고되었다.

이전 연구 결과 한국의 강물에서 아닐린을 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물들이 분리되어 이들 미생물들에 의한 아닐린의 분해가 보고된 바 있다[12]. 본 연구는 이들 중 아닐린 분해능이 우수한 균주 중의 한 균주인 *Delftia acidovorans* 51-A로부터 아닐린 분해관련 유전자를 분리하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

D. acidovorans 51-A와 그 transposon 삽입 변이체들은 nutrient agar(NA)에 통상배양하며 transposon 삽입 변이체들의 경우는 kanamycin 50 µg/ml을 첨가한 배지에서 배양하였다. 아닐린 분해능을 검정하기 위하여는 최소배지로 mineral salt 배지[12]를 이용하였으며 아닐린은 순정 1급 (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 300 µg/ml 첨가하였다. *E. coli* strain들은 Luria-Bertani(LB) 배지에 적절한 항생제를 첨가하여 배양하였는데 사용된 항생제들의 농도는 아래와 같았다: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml; Rifampicin 50 µg/ml. 사용한 균주와

plasmid는 Table 1에 명시하였다.

아닐린 분해검정

D. acidovorans 51-A와 그 transposon 변이체들의 아닐린 분해능을 이미 보고한 방법에 따라 검정하였다[12]. Nutrient broth에 밤새 배양한 균체를 4°C에서 10,000 rpm으로 원심 분리하고 15 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 최소배지인 mineral salt 배지로 현탁하여 550 nm에서 균체의 흡광도가 0.3(약 2.0×10^8 cfu/ml)이 되도록 희석하였다. 희석된 현탁액 200 ml에 아닐린을 300 µg/ml 되도록 첨가하여 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하면서 매 8시간 간격으로 시료를 수확하고 원심분리하여 상등액을 자외선 분광계를 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 조사하여 분해능을 검정하였다.

Transposon 삽입 변이유도

아닐린 분해에 관련된 유전자를 탐색하기 위하여 *D. acidovorans* 51-A를 transposon을 이용하여 변이체들을 아래와 같이 유기하였다. 사용한 transposon은 Tn5의 유도체인 Tn5-B20 이었다[21]. 먼저 *D. acidovorans* 51-A 균주를 rifampicin이 첨가된 NA 배지에서 계속하여 계대배양하고 생육시키면서 rifampicin 저항성이 안정화된 균주를 선발하고 *D. acidovorans* 51-A2R로 명명하였다. 선발된 균주로 transposon을 도입하기 위하여 *D. acidovorans* 51-A를 rifampicin이 첨가된 2 ml의 NB broth 배지에서 18시간 28°C에서 배양하고, transposon 제공 균주인 *E. coli* S17-1 (pSUP102-Cm::Tn5-B20)은 kanamycin이 첨가된 2 ml의

Table 1. Bacterial strains and plasmids used

Strains or plasmids	Relevant characteristics ^a	Source or Reference
<i>E. coli</i>		
S17-1	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA</i>	22
DH5α	F ⁻ <i>recA1 Δ(lacZYA-argF) U169 hsdR17 thi-1 gyra66 supE44 endA1 relA1 Δ(lacZ) M15</i>	19
<i>D. acidovorans</i>		
51-A	Wild type, aniline degradation	12
51-A2R	Rif ^r , derived from wild type	this study
4-5-1	Kan ^r , Tn5-B20 mutant	this study
10-4-2	Kan ^r , Tn5-B20 mutant	this study
10-3-3	Kan ^r , Tn5-B20 mutant	this study
Plasmids		
pUC119	Ap ^r , cloning vector	25
pUC129	Ap ^r , cloning vector	11
pSUP102-Cm::Tn5-B20	Km ^r , Tn5-derived transposable promoter probe	21
pHRP311	Gm ^r , Sm ^r , a RSF1010 derivative, broad-host-range transcriptional fusion vector	17
pUC10A	Ap ^r , a 16-kb <i>EcoRI</i> fragment carrying Tn5-B20 of <i>D. acidovorans</i> 10-4-2 in pUC119	this study
pUC10AX	Ap ^r , a 6.1-kb <i>XhoI</i> fragment of pUC10A in pUC129	this study
pTDN51	Aniline degradation	this study

^aAp^r, Ampicillin resistance; Gm^r, Gentamycin resistance; Km, Kanamycin resistance; Sm^r, Streptomycin resistance; Kan^r, chromosomal kanamycin resistance; Rif^r, chromosomal rifampicin resistance

LB broth에 37°C에서 18시간 진탕배양하였다. 두 균주는 각각 같은 항생제가 첨가된 새로운 LB broth 배지에 1/100로 희석하여 계대배양하였다. 각각 배양액의 600 nm에서 흡광도가 0.6과 0.8 사이일 때 1 ml씩을 취하여 원심분리 후 생리식염수로 2회 세척하고 각각을 1 ml의 생리식염수에 재현탁하였다. 두 균주의 현탁액을 membrane filter(0.45 µm pore size) 위에 혼합하여 membrane filter mating 방법[26]으로 transposon을 수용 균주인 *D. acidovorans* 51-A로 도입하고 rifampicin과 kanamycin이 첨가된 NA 배지에 도말하여 성장하는 콜로니들을 Tn5-B20 삽입 변이체로 선발하였다.

재조합 DNA

D. acidovorans 51-A의 총 DNA 분리, *E. coli*로부터 플라스미드 분리, 제한효소를 이용한 DNA 절단, DNA 재조합, DNA 형질전환, agarose 전기영동 등은 표준화된 분자생물학적 방법에 따라 수행하였다[19]. 아닐린 분해에 관련된 유전자를 transposon이 삽입된 변이체로부터 찾기 위하여 변이체 10-4-2로부터 총 DNA를 분리하여 *EcoRI*으로 절단하고 이들을 pUC119에 삽입하여 변이체 DNA library를 제작하였다. 제작된 DNA library를 *E. coli*에 형질전환하여 kanamycin과 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 Tn5-B20과 그 삽입위치의 주변 유전자들을 가진 clone을 선발할 수 있었다. 이는 변이체 10-4-2에 삽입된 Tn5-B20이 kanamycin 저항성 유전자를 가지고 있고 *EcoRI*에 의해 인식되는 부위가 kanamycin 저항성 유전자의 외부에 있기 때문에 가능하였다(Fig. 1). 선발된 clone은 pUC10A로 명명하였고 몇가지 제한효소로 제한효소 지도를 작성하였다. pUC10A로부터 6.1-kb의 *XhoI*으로 잘려지는 DNA 조각을 pUC129에 삽입하여 pUC10AX를 제작하였다. pUC10AX의 삽입 DNA가 변이체 10-4-2의 Tn5-B20의 삽입부위이므로 DNA 염기서열 결정에 이용하였다. DNA 염기서열 결정은 제노텍(Genotech, Daejeon, Korea)에서 자동화된 염기서열 결정법(ABI 3700)

을 이용하여 결정하였고 이를 위한 primer들은 제노텍에서 구입하였다. DNA 염기분석은 the National Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 수행하였다.

플라스미드 검출 및 Southern hybridization

아닐린을 분해하는 *D. acidovorans* 51-A 균주에 플라스미드가 존재하는지 여부는 이미 알려져 있는 방법에 따라 수행하였다[9]. Transposon 삽입변이체에서 transposon의 삽입 빈도 및 삽입 위치 결정을 위해 Southern hybridization을 수행하였다. Probe는 Tn5-B20에 존재하는 *lacZ* 유전자의 일부를 이용하였다. 먼저, pHRP311를 *HindIII*와 *EcoRV*로 절단하여 *lacZ*의 일부인 1.7-kb의 DNA 조각을 회수하였고 이를 digoxigenin-dUTP DNA labeling kit(Boehringer GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 labeling 하였다. *D. acidovorans* 51-A와 transposon 삽입 변이체로부터 분리한 플라스미드 DNA를 전기영동 후 nylon membrane으로 Southern blot 하였다. 한편 transposon을 자르지 않는 *BamHI*, *EcoRV*, *PstI*으로 51-A 균주와 그 transposon 삽입 변이체의 총 DNA를 절단하여 전기영동 후 nylon membrane으로 Southern blot 하였다. High stringency에서 hybridization 후 검출은 화학발광기질인 disodium 3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan-(4-yl) phenyl phosphate(CSPD; Boehringer)를 사용하여 수행하였다.

GenBank Accession 번호

본 연구에서 분리한 유전자들의 염기서열은 GenBank accession No. AY168646에 제출되어 있다.

결과 및 고찰

Transposon 삽입 변이균주 선발

D. acidovorans 51-A에 Tn5-B20을 삽입하여 총 5,670

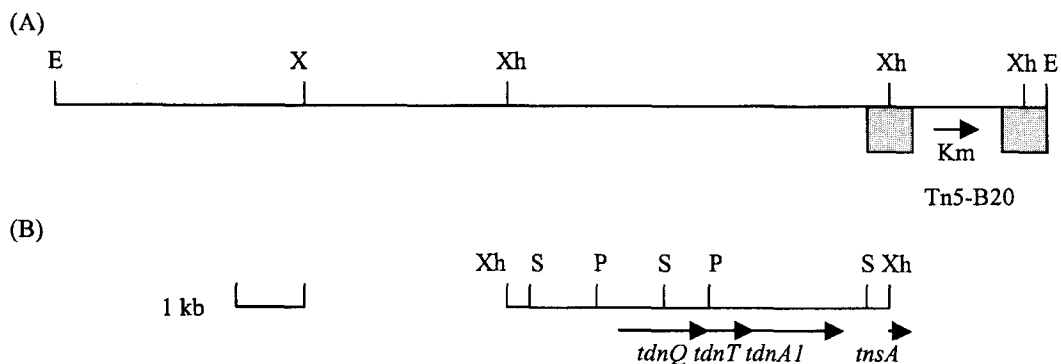


Fig. 1. Restriction map of pUC10A (A) and pUC10AX (B) carrying Tn5-B20 insertion in *tdn* operon of *D. acidovorans* 51-A. Km indicates the kanamycin resistance gene within Tn5-B20. *tnsA* is a gene encoding transposase of Tn5. E: *EcoRI*, P: *PstI*, S: *SphI*, X: *XbaI*, Xh: *XhoI*

변이체를 확보하여 아닐린 분해능을 검정하였다. 총 변이체들을 kanamycin이 첨가된 NA 배지와 아닐린이 첨가된 mineral salt agar 배지에 replica plating하여 아닐린이 첨가된 mineral salt 배지에서 자라지 못하거나 생장이 저하된 변이체들을 선발하였다. 이들 중 영양요구형 변이체들을 제거하고 3균주가 영양요구형이 아니면서 아닐린을 유일한 탄소원으로 이용하지 못하는 균주를 변이체로 선발되었다. 이들 중 변이체 10-4-2와 9-6-1은 아닐린이 첨가된 최소배지에서 전혀 자라지 못하였으며 4-5-1은 동일한 배지에서 51-A 균주에 비해 천천히 자랐다. 각 변이체들과 51-A의 아닐린 분해능을 검정한 결과 변이체 10-4-2와 9-6-1은 구별할 수 없을 정도로 차이가 없이 아닐린을 전혀 분해하지 못한 반면 (Fig. 2), 4-5-1 변이체는 지연이 되긴 했으나 3일후에는 대부분의 아닐린을 분해하여 아닐린 분해능에 약하게 영향을 받은 유형의 변이체로 구분하였다. 변이체 10-4-2와 9-6-1의 총 DNA를 세가지 제한효소(*Bam*HI, *Eco*RV, *Pst*I)로 절단하고 *lacZ* 유전자 probe로 Southern hybridization을 수행하였을 때 두 변이체 간의 차이가 전혀 발견되지 않았고 Tn5-B20도 single copy로 삽입되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 따라서 이후의 유전자 분리를 위해 변이체 균주 10-4-2를 지속적으로 이용하였다. 변이체 10-4-2는 아닐린을 분해하여 유일한 탄소원으로 이용하는 데 결정적인 유전자에 transposon이 삽입되었을 것으로 여겨졌으며 변이체 4-5-1의 경우 transposon 삽입 부위의 유전자가 아닐린 분해에 관여하지만 결정적으로 중요하지는 않을 것으로 고찰되었다. *D. acidovorans* 51-A와 그 transposon 삽입 변이체 10-4-2의 생장은 nutrient broth에서 검정하였을 때 아무런 차이가 발견되지 않았다.

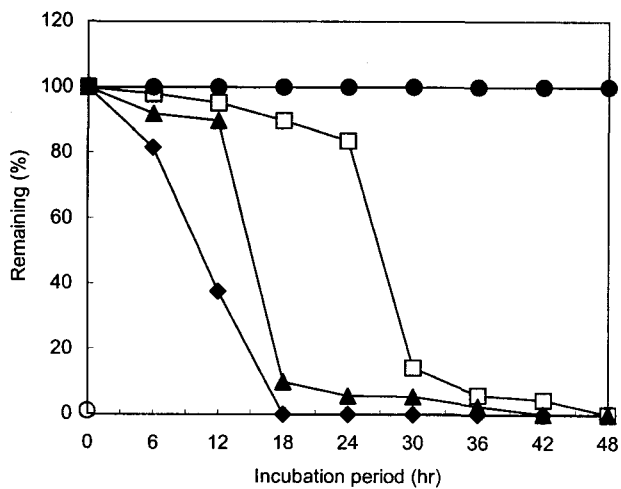


Fig. 2. Aniline degradation by *D. acidovorans* 51-A and transposon mutants in mineral salt media supplemented with 300 µg/ml of aniline over incubation period. X-axis represents the percentage of the remained aniline. *D. acidovorans* 51-A (◆); *D. acidovorans* 10-3-3 (▲); *D. acidovorans* 10-4-2 (●); *D. acidovorans* 4-5-1 (□).

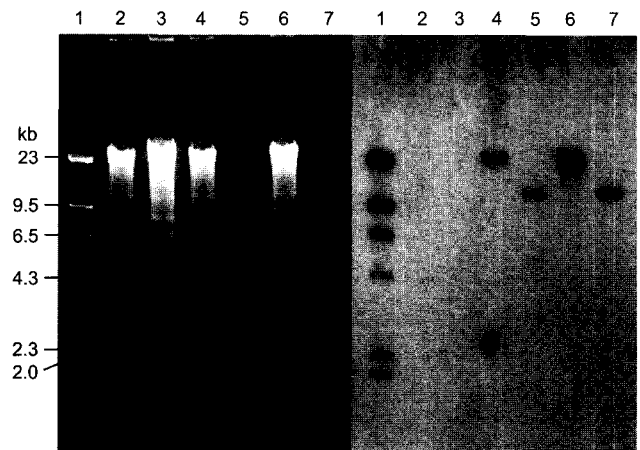


Fig. 3. Gel electrophoresis of total genomic DNA of *D. acidovorans* 51-A and transposon mutants and Southern hybridization of the genomic DNA with *lacZ* probe of Tn5-B20. 1. λ-DNA digested with *Hind*III; 2. *D. acidovorans* 51-A total DNA digested with *Bam*HI; 3. *D. acidovorans* 10-4-2 total DNA digested with *Bam*HI; 4. *D. acidovorans* 9-6-1 total DNA digested with *Bam*HI; 5. *D. acidovorans* 9-6-1 total DNA digested with *Pst*I; 6. *D. acidovorans* 10-4-2 total DNA digested with *Bam*HI; 7. *D. acidovorans* 10-4-2 total DNA digested with *Pst*I;

아닐린 분해관련 플라스미드 검출

아닐린을 분해하는 *D. acidovorans* 51-A에 플라스미드 존재 여부를 기존의 플라스미드 검출방법 [9]에 의해 수행하여 51-A 균주에 100-kb 이상의 커다란 플라스미드가 존재함을 알 수 있었다(Fig. 4). 모균주 51-A와 변이체 10-4-2로부터 검출된 플라스미드를 이용하여 *lacZ* probe로 Southern hybridization 결과 변이체 10-4-2의 플라스미드에서 hybridization 신호를

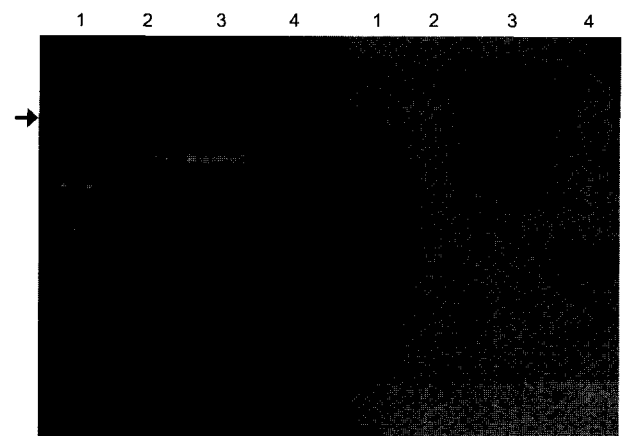


Fig. 4. Gel electrophoresis of plasmids from *D. acidovorans* 51-A and 10-4-2 and Southern hybridization with *lacZ* probe of Tn5-B20. Arrow indicates the plasmid pTDN51 from *D. acidovorans* strains. 1. λ-DNA digested with *Hind*III; 2. Plasmid isolated from *D. acidovorans* 51-A; 3. Plasmid isolated from *D. acidovorans* 10-4-2; 4. linearized plasmid pUC119 carrying 3.5-kb *lacZ*.

* * * * *

```

Da 85 -QIRVFSNRCSHRGATVCREHQGNAAFTCPYHGWRFDNRGQLFGIIPGKN- 134
Pp 85 VTRVFSNRCSHRGASVCREHRGNAAFTCPYHGWRFDNRGQLFGIIPGKN- 134
Xa 47 -RFHAYDGIICPHQ-SVSLVEGHLTEDGLICKAHEWQFSVEGGQGINPANV- 95
  
```

Fig. 5. Alignment of Rieske [2Fe-2S] domain of TdnA1 from *D. acidovorans* (Da), *P. putida* (Pp) [6; GenBank Accession D85415], and XamoC from *Xanthobacter* strain Py2 (Xa) [28; GenBank Accession AJ012090]. Identical amino acids are shown as shade. Asterisks indicate the conserved motifs, the Rieske domains (CXH, CXXH).

관찰할 수 있었다(Fig. 4). 즉 aniline을 분해하지 못하는 변이체 10-4-2의 경우 Fig. 3처럼 Tn5-B20이 single copy로 삽입되었고 이는 대형 플라스미드에 삽입된 것으로 보아 *D. acidovorans* 51-A에서 아닐린 분해에 관련된 유전자들이 대형 플라스미드에 위치함을 알 수 있었다. 검출된 플라스미드는 pTDN51로 명명하였다. 비슷하게 아닐린을 분해하는 *P. putida* mt-2(ATCC33015)의 경우 아닐린을 catechol로 전환하는 유전자들이 대형 플라스미드인 pTDN1에 위치하여 있음이 알려져 있다[6, 16]. 최근에 아닐린을 분해할 수 있는 Comamonadaceae에 속하는 *Comamonas testosteroni*와 *D. acidovorans* 균주들이 *tdnQ* 유전자를 플라스미드에 보유하고 있으며 아닐린 분해능 등에 있어서 다양함이 또한 알려졌다[3]. 이는 아닐린 분해에 관련된 유전자들이 Comamonadaceae 및 Pseudomonadaceae에 일반적으로 플라스미드에 존재하며 horizontal gene transfer에 의해 상당히 확산되어 있으며 다양하게 변이되어 왔을 가능성을 제시하였다.

DNA 염기서열 결정 및 *tdn* 유전자들의 동정

선발된 변이체 10-4-2로부터 Tn5-B20이 삽입된 부위의 유전자들을 획득하여 6.1-kb의 DNA 염기서열을 결정하였다. Tn5의 transposase(*tnsA*)를 encode하는 유전자와 100% 일치하는 부위가 발견이 되어 cloning한 부위가 *D. acidovorans* 10-4-2 변이체에서 Tn5-B20 삽입된 인접부위임을 알 수 있었다. *TnsA*의 upstream에서 세계의 완벽한 open reading frame(ORF)들이 발견되었는데 이들은 기존의 *P. putida* mt-2 균주에서 보고된 pTDN1 플라스미드내 *tdn* operon의 *tdnQ*, *tdnT*, *tdnA1*의 deduced 아미노산서열[6]과 높은 상동성을 보였다. 따라서 *D. acidovorans* 51-A에서 분리된 유전자들도 동일하게 *tdnQ*, *tdnT*, *tdnA1*으로 명명하였다(Fig. 1). 변이체 10-4-2에 삽입된 Tn5-B20은 *tdnA1*의 stop codon (TGA) 바로 downstream에 발견되었다. *D. acidovorans* 51-A의 *tdn* operon과 이미 보고된 pTDN1의 *tdn* operon과의 operon 구성을 비교할 때 Tn5-B20은 pTDN51의 *tdnA1*과 *tdnA2* 사이에 삽입되었다고 예상된다(Fig. 1). 본 연구결과로는 pTDN51에서도 *tdnA1*의 downstream에 *tdnA2*, *tdnB*, *tdnR*이 실제 존재할지는 알 수 없었다. *P. putida* mt-2의 pTDN1[6]과 *D. acidovorans* 51-A의 pTDN51 유전자들 사이의 deduced 아미노산 서열간의 상동성은 아래와 같다: *tdnQ*(86% identity), *tdnT*(65% identity), *tdnA1*(82% identity).

각 유전자의 deduced 아미노산 서열을 비교하면 TdnA1에서 아닐린 oxygenase의 large subunit이 가지고 있는 conserved domain인 [2Fe-2S]R Rieske-type ligand center(Fig. 5)가 발견되었다[18].

아직까지 아닐린을 분해하는 Comamonadaceae 그룹의 균주로부터 *tdn* operon의 full-length가 보고되지 않았고 단지 *D. acidovorans* 균주 등에서 *tdnQ* 유전자의 염기서열이 부분적으로 보고되었다[3]. 이 부분적인 *tdnQ*의 deduced 아미노산 서열과 본 균주 51-A의 *tdnQ*의 deduced 아미노산 서열 사이에 해당부위에서 99% identity를 보였다. 따라서 본 연구 결과를 통해 얻은 *tdn* operon 유전자들은 *D. acidovorans* LME1과 CA28 균주들의 *tdn* operon 유전자들과 가장 가까운 것으로 예측할 수 있었다. 아직까지 이들 균주들에서 *tdn* operon 유전자들은 완전히 cloning 되어 있지 못하며 단지 *tdnQ* 유전자의 일부만 cloning 되어 있는 상태이다[3]. 아직까지 이들 유전자들은 deduced 아미노산 서열에 의해 기능이 유추되고 있을 뿐 유전자 산물의 각각의 기능은 알려져 있지 않다[6]. 한편 본 연구에서 분리된 유전자들 중 *tdnA1*이 *Acinetobacter* sp. 균주 YAA에서 아닐린 산화에 관여하는 aniline oxygenase gene *atdA*[5, 24]와 아미노산 서열에서 53% 일치하였다.

현재까지 수서환경에서 아닐린의 분해는 주로 생물적인 것으로 알려져 왔는데[7, 15] 그 호기적인 분해의 첫 단계는 아닐린을 catechol로 전환하는 산화적 deamination 이다. 최근 *P. putida* pTDN1에서 클로닝된 *tdn* operon의 유전자들이 산화적 deamination에 관련되어 있을 것으로 예상되지만, 그들의 기능은 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않고 다만 유전자 산물에 기초하여 유추한 아닐린의 catechol로 전환의 과정이 추론되었다[6]. *D. acidovorans* 51-A에서 분리된 유전자들도 기능적으로 pTDN1의 유전자들과 동일한 기능을 가지고 있을 것으로 예상된다.

요 약

아닐린을 분해할 수 있는 *Delftia acidovorans* 51-A가 기존에 분리되어 아닐린 분해능이 우수함이 보고되었다. 이 균주로부터 아닐린 분해관련 유전자를 선발하기 위하여 Tn5-B20 삽입 변이체들을 유도하여 영양요구형이 아니면서 아닐린을 분해할 수 없는 변이균주 *D. acidovorans* 10-4-2 균주

를 선발하였다. Southern hybridization 결과 이 변이균주에는 Tn5-B20이 한 copy만 삽입된 것으로 나타났다. 이 변이균주의 Tn5-B20 삽입의 인접 유전자들을 분리하여 염기서열을 분석한 결과 아닐린 분해의 첫 단계에 해당하는 아닐린의 catechol로의 산화적 deamination에 관련되어 있는 것으로 추정하는 *tdnQ*, *tdnT*, *tdnA1* 유전자들이 동정되었고 Tn5-B20은 *tdnA1*의 바로 밑에 삽입된 것을 알 수 있었다. *TdnA2* 및 downstream의 유전자 기능을 상실하여 아닐린을 catechol로 전환하는 과정에 변이가 발생하고 따라서 아닐린을 탄소원으로 이용하지 못하는 표현형을 가지게 된 것으로 결론지을 수 있었다. Tn5-B20의 일부 DNA 조각을 probe로 Southern hybridization 결과 transposon 삽입이 대형의 플라스미드에 삽입된 것으로 나타나 *tdn* 유전자들이 pTDN51이라고 명명한 100-kb 이상의 대형 플라스미드에 위치함을 알 수 있었다. 이상의 결과는 *D. acidovorans* 51-A의 pTDN51상의 *tdn* 유전자들이 아닐린의 분해에 관여함을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 특정연구개발사업 (I-03-046) 지원으로 진행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Aoki, K., K. Ohtsuka, R. Shinke, and H. Nishima. 1984. Rapid biodegradation of aniline by *Frateria* species ANA-18 and its aniline metabolism. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 865-872.
- Bollag, J.-M., P. Blattmann, and T. Laanio. 1978. Adsorption and transformation of four substituted anilines in soil. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 1302-1306.
- Boon, N., J. Goris, P. De Vos, W. Verstraete, and E. M. Top. 2001. Genetic diversity among 3-chloroaniline- and aniline-degrading strains of the Comamonadaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1107-1115.
- Chabra, R. S., M. Thompson, M. R. Elwell, and A. C. Peters. 1990. Toxicity of *p*-chloroaniline in rats and mice. *Food. Chem. Toxicol.* **28**: 717-722.
- Fujii, T., M. Takeo, and Y. Maeda. 1997. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology* **143**: 93-99.
- Fukumori, F. and C. P. Saint. 1997. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1). *J. Bacteriol.* **179**: 399-408.
- Gheewala, S. H. and A. P. Annachatre. 1997. Biodegradation of aniline. *Water Sci. Technol.* **36**: 53-63.
- Hagblom, M. M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 29-72.
- Kado, C. I. and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Kearney, P. C. and D. D. Kaufman. 1975. *Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197.
- Kim, H.-J., J.-C. Kim, H. T. Kim, G. J. Choi, D. Choi, H. G. Kim, and K. Y. Cho. 2000. Isolation and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* strains capable of degrading aniline. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 202-208.
- Konopka, A. 1993. Isolation and characterization of a subsurface bacterium that degrades aniline and methylanilines. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 93-100.
- Loidl, M., C. Hinteregger, G. Ditzelmuller, A. Ferschl, and F. Streichsbier. 1990. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains. *Arch. Microbiol.* **155**: 56-61.
- Lyons, C. D., S. Katz, and R. Bartha. 1984. Mechanisms and pathway of aniline elimination from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 491-496.
- McClure, N. C. and W. A. Venables. 1987. pTDN1, a catabolic plasmid involved in aromatic amine catabolism in *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2073-2077.
- Parales, R. E., and C. S. Harwood. 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram⁻ bacteria. *Gene* **133**: 23-30.
- Rieske, J. S., D. H. MacLennan, and R. Coleman. 1964. Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**: 338-344.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schnell, S. and B. Schink. 1991. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **153**: 183-190.
- Simon, R., J. Quandt, and W. Klipp. 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **80**: 161-169.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Swaminathan, S., S. M. Frederickson, J. F. Hatcher, C. A. Reznikoff, M. A. Butler, K. L. Cheever, and R. E. Savage. 1996. Neoplastic transformation and DNA-binding of 2-chloroaniline in SV40-immortalized human uroepithelial cell lines. *Carcinogenesis* **17**: 857-864.
- Takeo, M., T. Fujii, and Y. Maeda. 1998. Sequence analysis of the genes encoding a multicomponent dioxygenase involved in oxidation of aniline and o-toluidine in *Acinetobacter* sp. strain YAA. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 17-24.

25. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. *Gene* **33**:103-119.
26. Willets, N. 1984. Conjugation. *Methods Microbiol.* **17**: 33-59.
27. Zeyer, J., A. Wasserfallen, and K. N. Timmis. 1985. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an *ortho*-cleavage pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 447-453.
28. Zhou, N. Y., A. Jenkins, C. K. N. Chan Kwo Chion, and D. J. Leak. 1999. The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene, and phenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1589-1595.

(Received Oct. 28, 2002/Accepted Dec. 30, 2002)