

## Stenotrophomonas sp. OK-5에서 분리한 NAD(P)H-Nitroreductase의 생리학적 및 분자생물학적 특성 연구

호은미 · 강형일<sup>1</sup> · 오계현\*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>순천대학교 사범대학 환경교육과

TNT 분해 세균 *Stenotrophomonas* sp. OK-5는 세 개의 다른 NAD(P)H-nitroreductase의 활성 fractions (NTR fractions I, II, III)을 갖고 있는 것으로 확인된 바 있다. 본 연구에서는 NTR fractions I, II, III에 대한 생리학적 특성과 분자생물학적 특성을 규명하고자 하였다. TNT에 대한 균주 OK-5의 NTR fractions I, II, 그리고 III의 활성은 억제 물질인  $\beta$ -mercaptoethanol의 첨가 시에 효소의 활성이 모두 억제되는 것으로 확인되었다. TNT와 그 유사 기질을 이용하여 균주 OK-5에서 분리된 NTR의 기질 특이성을 조사한 결과, nitrobenzene, 그리고 RDX에 대해서는 비교적 활성이 높게 나타났으나 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 낮은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 균주 OK-5에서 정제된 NTR fraction I의 N-말단 아미노산 서열은 <sup>1</sup>MSDLLNADAVVQLFRTARDS<sup>20</sup>로 분석되었고, *Xanthomonas campestris*의 NTR과 *X. axonopodis*의 NTR에서 각각 70%와 65%로 비교적 높은 유사성을 가지는 것으로 나타났다. 균주 OK-5의 NTR fraction I의 효소를 암호화하는 *SmOK5nrI* 유전자의 염기서열을 확인하고 분석된 유전자로부터 유추되는 아미노산 서열을 각각 비교한 결과 *X. campestris*의 NTR과 81%, *X. axonopodis*의 NTR과 75%, 그리고 *Streptomyces avermitilis*의 NTR과 30%의 유사성이 있는 것으로 조사되었으나, *Pseudomonas putida* KT2440의 NTR (*pnrB*)과는 16%로 낮은 유사성이 있는 것으로 확인되었다.

**Key words** □ TNT, *Stenotrophomonas* sp. OK-5, nitroreductase, specific activity, amino acids sequence analysis

니트로 화합물은 대부분이 자연 중에서 분해가 어렵고 환경에서 오랜 기간 동안 잔류하여 독성을 나타내면서 생태계에 심각한 문제를 일으킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(1). 니트로 방향족 화합물의 미생물학적 제거는 방향족 고리에서 니트로 기(group)들이 제거되어 hydroxylamino 유도체와 아미노 유도체들로 전환이 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 이들에 대한 연구도 많은 연구자들에 의해 활발히 진행되고 있다(11, 23). 대표적인 니트로 방향족 화합물인 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)는 폭발물의 원료로서 산업적, 군사적으로 널리 사용되고 있다. TNT는 방향족 고리에 세 개의 니트로 기(group)가 대칭적으로 위치하기 때문에 구조적으로 매우 안정하여 자연 생태계에 노출되었을 때 생분해가 매우 느리거나 어려워 생태계를 오염시켜 커다란 환경 문제를 일으키는 것으로 알려져 있다(10). 이러한 TNT는 자연에서 서서히 광분해(photolysis)되는 것으로 알려져 있으며(8), 미생물에 의한 효율적인 TNT 제거에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 현재 알려진 미생물에 의한 TNT의 생분해에는 nitroreductase (NTR)가 작용하는 것으로 알려져 있다. TNT의 분해에 관여하는 주요 효소인 NTR은 nitrobenzene nitroreductase와 NAD(P)H-nitroreductase의 두 가지 종류의 효소로 다시 구분되어 진다. TNT는 초기에 상기의 다른 두 효소에 의하여 각각 다른 과정으

로 분해가 일어나는데, 먼저 nitrobenzene nitroreductase는 TNT에 작용하여 중간산물인 4-hydroxyl-amino-2,6-dinitrotoluene과 4-amino-2,6-dinitrotoluene을 생성하고, 이와 달리 NAD(P)H-nitroreductase는 TNT로부터 중간산물 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluene과 2-amino-4,6-dinitrotoluene을 생성하는 것으로 보고되고 있다(16). TNT를 포함하여 다양한 니트로 방향족 화합물의 분해를 촉매하는 NTR은 조효소(cofactor)로 널리 알려진 FMN이 효소활성 부위에 결합된 구조로 이루어진 flavoprotein으로써 보고되고 있으며, 분해 시에 전자 공여체(electron donor)로써 NADH나 NADPH, 혹은 다른 nicotinamide를 이용하는 것으로 알려져 있다(6).

NTR은 대사 과정에서 NADH나 NADPH에서 환원되는 전자의 개수와 대사 과정에서의 산소에 대한 민감성의 여부에 따라 type I과 type II로 구분되어 진다(6, 17). Type I에 속하는 NTR은 산소에 민감하지 않은(oxygen-insensitive) 것으로 니트로 방향족에서 두 개의 전자를 환원시킴으로써 nitroso 화합물이나 hydroxylamine과 같은 중간 대사산물을 생성하고, 최종적으로 미생물이 이용할 수 있는 형태로 전환되는 것을 촉매하는 것으로 보고되고 있다(5, 7). Type II에 속하는 NTR은 산소에 민감한(oxygen-sensitive) 집단으로서, 이들에 대한 연구는 약 7% 정도에 불과하여 정확한 특성이 보고되지 않고 있는 실정이다. NTR의 type II의 특징은 니트로 방향족으로부터 한 개의 전자를 환원시켜 음이온 라디칼(anion-radicals)을 형성하게 되고, 산소에 의해서 쉽게 재산화(reoxidation)가 되어 세포내의 단백질, 핵산,

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

그리고 지질에 치명적인 영향을 줄 수 있는 superoxide, hydrogen peroxide, 그리고 hydroxyl radical 등을 생성하는 것으로 알려져 있다(18, 22, 24). 본 연구에서는 이미 TNT 분해 세균인 *Stenotrophomonas* sp. OK-5로부터 NTR을 분리 및 정제하여 다양한 물리화학적 특성 조사를 실시하고 그 결과 type I에 속하는 *Enterobacter cloacae*의 NTR과 유사한 것으로 보고한 바 있다(13).

선진국에서는 1990년부터 니트로 방향족 화합물의 분해능이 우수한 세균에서 분리된 NTR의 염기 서열과 발현된 단백질체의 구조적인 기능을 규명하기 위하여 분자 생물학적 연구가 활발히 진행되고 있다. *Salmonella typhimurium*으로부터 NTR 유전자를 *Escherichia coli*에 cloning한 Watanabe 등(25)은 NTR의 염기 서열을 분석하여 단백질 1차 구조를 규명하였으며, French 등(9)은 *E. cloacae*에서 분리된 NTR의 N-말단 아미노산 서열을 확인하고 유사종과의 상동성을 조사한 실험에서 *E. coli*와 *S. typhimurium*의 NTR과 80% 이상의 높은 유사성을 가지는 것으로 보고하였다. 또한 Hecht 등(12)은 NTR의 단백질 3차 구조를 조사하기 위하여 *Thermus thermophilus*로부터 NTR을 분리하고 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance) 분석기로 분석하여 이들이 homodimer로 이루어져 있으며 각각의 monomer가 두 개의 domain과 C-말단 부위가 서로 연결되어있는 구조로 되어있는 것을 밝혔다. Kobori 등(14)은 X-ray를 이용한 결정학적 분석(crystallographic analysis)을 통하여 *E. coli*의 NTR이 효소 활성 부위에 FMN을 포함한 단백질의 구조를 가진 homodimer임을 확인하였다. Bryant 등(6)은 *E. coli*의 chromosomal DNA에서 NTR type I의 *nfsA* 유전자와 *nfsB* 유전자의 위치를 탐색하고 각각을 cloning하여 서열을 분석하였고, Nokhbeh 등(19)은 *Salmonella enterica* TA1535 균주에서 NTR을 암호화하는 유전자 *snrA*의 염기 서열을 조사하고 *nfsA* 유전자와 높은 상동성이 존재하는 것으로 보고하였다. *E. cloacae*로부터 분리된 NTR 유전자의 염기 서열을 이용하여 돌연변이를 획득한 Koder 등(15)은 pUC18 plasmid로 새로운 유전자를 subcloning하여 vector를 제작하고, *E. coli*에서 다량발현(overexpression)시켜 넓은 범위의 온도와 pH에서도 높은 활성이 있는 NTR을 얻는데 성공하였다. 이전 연구에서 *Stenotrophomonas* sp. OK-5로부터 분리한 NTR 활성을 갖는 세 개의 fraction의 분자량은 모두 27 kDa이었으며(13), 이는 Whiteway 등(26)이 nitrofurane에 노출된 *E. coli*에서 밝힌 27 kDa과 24 kDa인 NTR과는 다른 것으로 확인되었다.

본 연구에서는 TNT 분해 세균 *Stenotrophomonas* sp. OK-5로부터 분리한 NADP(H)-NTR에 대한 생리학적 및 분자생물학적 실험을 통하여 그 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### NTR의 정제 및 활성 측정

NTR은 필요에 따라 앞에서 보고한 방법(13)에 따라 분리·정제하여 사용하였다. 단백질 분리 시 항상 Bradford 방법(4)으로 단백질을 정량하였으며, NTR의 정제 여부와 분자량은 Bollag 등

(3)의 방법을 이용하여 12% SDS-PAGE 상에서 확인하였다. 정제된 NTR은 전자 공여체인 NADH의 산화를 측정하는 French 방법(9)에 의해서 활성을 측정하였다. NTR의 활성측정은 Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5)에 기질로 TNT (0.1 mM), NADH (0.2 mM)와 정제한 NTR을 최종 1 ml로 맞추어 첨가한 후 분광광도계를 이용하여 반응 산물인 NADH의 몰 흡광계수가  $6,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 이므로 340 nm에서 1분 동안 NADH가 산화되면서 감소되는 값으로 나타내었다. 1 unit은 25°C에서 분당 1 mole의 NADH가 산화되는 양으로 정하고, 특이활성(specific activity)은 unit/mg으로 정하였다.

### NTR 활성에 미치는 억제물질의 효과

효소 활성의 억제물질을 조사하기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 각각 1 mM의 농도로 억제 물질을 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후, 0.1 mM TNT를 200  $\mu\text{l}$ , 0.2 mM NADH 용액 및 분리된 효소 용액을 각각 10  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 최종 1 ml로 맞추어 실온에서 1분간 반응시킨 후에 흡광도를 측정하였다. 억제물질을 첨가하지 않았을 때 나타나는 효소활성을 100% 기준으로 하여 상대적 활성을 측정하였다.

### NTR의 기질 특이성

TNT와 그 유사체를 기질로 하여 NTR의 기질 특이성을 조사하였다. 유사 기질에 대한 NTR의 효소 활성 측정은 TNT에 대한 효소 활성 측정과 동일한 방법으로 실시하였다. RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine), nitrobenzene, 2,6-DNT (2,6-dinitrotoluene), 2,4-DNT (2,4-dinitrotoluene)를 각각 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 반응 용액에 첨가하고 0.2 mM NADH와 효소 용액을 첨가하여 반응시킨 후, 340 nm에서 1분 동안 NADH가 산화되면서 감소되는 값을 각각 측정하였다. TNT를 기질로 사용한 효소 활성 측정값을 100%로 하여 상대적 활성을 조사하였다.

### NTR의 N-말단 서열 분석과 상동성 조사

정제된 NTR을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전개하고 전개한 gel로부터 semidry electroblotter (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 PVDF membrane (Biosystems, Foster City, USA)으로 18 V에서 20분 동안 옮겼다. 효소 단백질이 옮겨진 PVDF membrane을 coomassie blue R-250 용액으로 10분간 염색하고, 50%의 methanol로 탈염색을 실시하여 염색된 단백질 부분을 잘라내었다. 잘라낸 PVDF membrane을 한국기초과학지원연구원의 단백질 자동 서열 분석기(Model 491A, Perkin Elmer, Foster City, USA)에 넣고 아미노산 서열을 분석하였다. 얻어진 N-말단 서열은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 동정하였으며, 다른 종과의 유사성을 조사하였다.

### NTR 유전자의 증폭

분해 세균 OK-5의 NTR 유전자의 증폭을 위한 PCR 실험 및 염기 서열 결정에 사용되어질 primer를 제작하기 위하여 분석된 아미노산 서열 중에서 N-말단으로부터 7개의 아미노산 서열을

이용하여 emNRO101을 제작하고, emNRO101 부위와 연결되어 있는 부위의 7개의 아미노산 서열을 이용하여 nested primer인 emNRO1-1을 제작하였으며, 이들을 forward primer로 사용하였다. 반면에 reverse primer를 제작하기 위하여 Genbank로부터 기존에 보고된 바 있는 다른 균주의 NTR 유전자로부터 아미노산 서열을 획득한 후 상호 비교하였다. 각 서열상에서 높은 상동성을 보이는 부위로부터 유전자 서열을 이용하여 specific primer를 제작하고 이를 emNRO102라 명명하였다(Table 1). NTR 유전자 단편을 확인하기 위하여 분리된 OK-5의 genomic DNA를 주형으로 상기의 방법으로 제작된 forward primer와 reverse primer를 Premix PCR tube (AccuPower<sup>®</sup> PCR PreMix, Bioneer Co., Chung-Buk, Korea)에 각각 첨가하여 PCR (MJ Research, Waltham, USA)을 수행하였다. PCR의 운전 조건은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초의 과정을 30 cycles 반응하였다. DNA의 증폭 여부를 확인하기 위하여 0.8% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하였고, gel로부터 원하는 DNA 단편은 AccuPrep<sup>®</sup> gel purification kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하여 회수하였다.

#### NTR 유전자의 염기서열 분석과 상동성 조사

PCR을 통해 얻어진 균주 OK-5의 NTR 유전자를 vector pBluescriptIIKS(+)에 subcloning하고자 하였다. 먼저 vector DNA에 제한 효소 EcoRV를 첨가하여 1시간 동안 반응시키고 agarose 전기영동을 실시하여 절단 여부를 확인한 뒤, 준비된 vector와 insert DNA절편의 농도를 1:3의 비율로 혼합한 후 혼합액과 동일량의 rapid DNA ligase I (Takara Co., Seoul, Korea)을 첨가하여 16°C에서 15~30분간 반응시켰다. Ligation mixture와 *E. coli* competent cell을 혼합하여 42°C에서 30초 동안 heat shock을 가한 후, 혼합액을 100 µg/ml의 ampicillin과 50 µl의 X-gal이 첨가된 LB 평판 배지에 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 subclone을 확보하였다. Subcloning된 OK-5의 NTR 유전자의 서열을 결정하기 위하여 각각의 subclone으로부터 DNA를 회수하였다. NTR 유전자 서열을 분석하기 위하여 사용된 primer는 nested primer인 emNRO1-1과 pBluescriptIIKS(+)의 universal primer인 M13 primer를 이용하여 자동염기서열 분석기 (Model 3700, ABI, Piscataway, USA)를 통한 분석을 실시하였다. 분석된 OK-5의 NTR 유전자 서열은 NCBI의 BLAST search 프

로그래를 이용하여 각각 상동성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

#### NTR 활성에 미치는 억제물질의 효과

균주 OK-5의 NTR 효소 활성에 대한 억제물질을 조사하기 위하여 실시한 결과, NTR fraction I은 dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl에 의해서 각각 66.7%, 43.0%, 36.8%로 저해되는 것으로 나타났으나, β-mercaptoethanol의 첨가 시에는 효소의 활성이 모두 억제되는 것으로 나타났다. NTR fraction II에 대한 조사에서는 dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl에 의해서 각각 67.3%, 41.9%, 39.4%로 저해되는 것으로 나타났으나, 역시 β-mercaptoethanol의 첨가 시에는 효소의 활성이 모두 억제되는 것을 확인하였다. NTR fraction III는 dithiothreitol, EDTA, 그리고 NaCl에 의해서 각각 59.1%, 42.1%, 39.7%로 저해되었으나, β-mercaptoethanol을 첨가 시에는 효소의 활성이 억제되는 것으로 나타났다 (Table 1). Oh 등(20)은 TNT에 노출된 *P. aeruginosa*에서 분리한 NTR을 이용하여 다양한 억제 물질에 대한 효소 활성을 측정된 결과, dithiothreitol, ascorbic acid, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때 최대 활성의 60%정도 저해되는 것으로 조사하였으며, β-mercaptoethanol과 Triton X-100의 첨가 시에는 효소의 활성을 거의 억제하는 것으로 보고하여 본 연구의 결과와 비슷한 것으로 나타났다.

#### NTR의 기질 특이성

TNT와 그 유사체를 기질로 하여 NTR fractions I, II, 그리고 III의 기질 특이성을 조사하였다. OK-5에서 분리한 NTR fraction I은 TNT, nitrobenzene, 그리고 RDX에 대해서는 각각 100%, 83.6%, 그리고 80.9%로 활성이 비교적 높게 나타났으나 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 41.5%와 18.9%로 낮은 활성을 나타내었다. NTR fraction II의 기질 특이성에 대하여 조사한 결과, TNT, nitrobenzene, RDX에서는 각각 100%, 79.9%, 76.0%로 활성을 나타냈으며, 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 42.3%와 17.7%의 활성을 나타내었다. NTR fraction III는 TNT, nitrobenzene, 그리고 RDX에서는 각각 100%, 81.4%, 그리고 79.1%로 활성이 나타났으며, 2,6-DNT와 2,4-DNT에서는 40.7%와 18.3%의 활성을 나타내었다(Table 2). Riefler 등(21)은 니트로 기(nitro group)가 대칭적으로 결합되어 있는 TNT의 대사에서는 환원반응이 요구되어

**Table 1.** Effects of specific inhibitors on the activity of nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Stenotrophomonas* sp. OK-5

Inhibitors	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		Fraction I	Fraction II	Fraction III
None	0	100	100	100
Dithiothreitol	1	66.7	67.3	59.1
EDTA	1	43.0	41.9	42.1
NaCl	1	36.8	39.4	39.7
β-mercaptoethanol	1	0	0	3

**Table 2.** Substrate specificities of nitroreductase fractions I, II, and III purified from *Stenotrophomonas* sp. OK-5

Substrates	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		Fraction I	Fraction II	Fraction III
TNT	0.1	100	100	100
Nitrobenzene	0.1	83.6	79.9	81.4
RDX	0.1	80.9	76.0	79.1
2,6-DNT	0.1	41.5	42.3	40.7
2,4-DNT	0.1	18.9	17.7	18.3

	1	5	10	15	20
<i>Stenotrophomonas</i> sp. OK-5	M	S D L L	N A D A	V V Q L F R T A	R D S
<i>Xanthomonas campestris</i>	M	S D S L	N A A A	L D Q L F R T A	R T Q
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	M	S D S S	N A A A	L D Q L F R T A	R T Q
<i>Pseudomonas putida</i>	M	S L Q D E A	L K A W Q A	R Y G E P A	N
<i>Xylella fastidiosa</i>	M	N T L Y P L	H A L D A R R S	V P S R	Q

**Fig. 1.** Sequence alignment of N-terminal sequence of nitroreductase fraction I with *Stenotrophomonas* sp. OK-5, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas putida*, *Xylella fastidiosa*. The nitroreductase of *Stenotrophomonas* sp. OK-5 showed 70% similarity with nitroreductase of *Xanthomonas campestris* and 65% with nitroreductase of *Xanthomonas axonopodis*.

지나, 2,6-DNT나 2,4-DNT 등은 산소화 반응에 참여하는 oxygenase에 의한 작용을 받아 분해될 수 있기 때문에 환원되는 과정을 거치지 않으므로 reductase에 의해 큰 영향을 받지 않는다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 OK-5의 NTR에 대한 2,6-DNT나 2,4-DNT의 기질 특이성을 간접적으로 입증할 수 있는 것으로 제시된다.

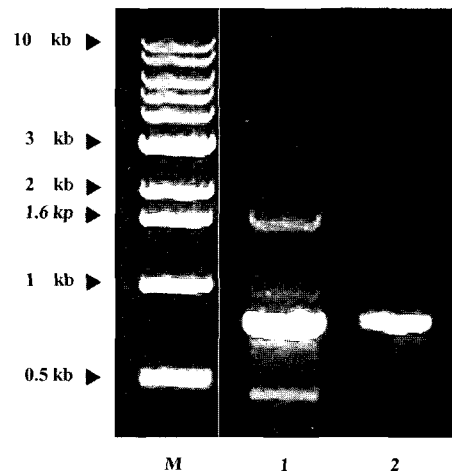
**NTR의 N-말단 서열의 상동성 및 PCR용 프라이머**

기존의 다른 세균들에서 보고된 NTR과 OK-5로부터 분리된 NTR의 유사성을 알아보기 위하여 세 개의 NTR 중 특이 활성이 가장 높게 나타난 NTR fraction I의 N-말단 서열을 분석하였다. OK-5에서 분리된 NTR fraction I의 N-말단 서열을 아미노산 자동 염기서열 분석기를 통해 분석하여 N-말단으로부터 분석된 20개의 아미노산 서열은 Met-Ser-Asp-Leu-Leu-Asn-Ala-Asp-Ala-Val-Val-Gln-Leu-Phe-Arg-Thr-Ala-Arg-Asp-Ser으로 확인되었다. 확인된 아미노산 서열은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 서열의 유사성을 검색한 결과 *Xanthomonas campestris*의 NTR과 *X. axonopodis*의 NTR에서 각각 70%와 65%로 비교적 높은 유사성이 나타났으며, *Pseudomonas putida*의 NTR (*pnrB*)과 *Xylella fastidiosa*의 NTR과는 유사성이 각각 20%와 15%로 낮게 조사되었다(Fig. 2). Blehert 등(2)은 *P. putida*와 *P. fluorescens*에서 각각 분리된 NTR의 N-말단 서열을 분석하고 상호 비교한 결과, 34%의 상동성이 있는 것으로 확인하였다. 한편, *P. putida* JLR11에서 *pnrA*와 *pnrB*의 두 종류의 NTR을 분리하여 N-말단 서열을 분석하고 비교한 결과 10%로 매우 낮은 유사성을 가지고 있는 것으로 보고하였다. 본 연구에서의 OK-5에서 얻어진 NTR의 N-말단 서열은 *P. putida*의 *pnrB*와 낮은 유사성이 있는 것을 확인하였다. 위에서 밝혀진 균주 OK-5 reductase의 아미노산 서열과 D/B 검색을 통해 얻은 자료를 바탕으로 nitroreductase

유전자를 증폭하는데 사용하기 위해 degenerate 프라이머를 제작하였으며 자세한 서열정보는 Table 3에 나타내었다.

**NTR 유전자의 염기서열 분석과 상동성 조사**

균주 OK-5에서 분리된 NTR fraction I을 암호화하는 유전자 *SmOK5nrI*를 확인하고 OK-5의 genomic DNA에서 *SmOK5nrI* 유전자의 위치를 탐색하기 위하여, 분석되어진 N-말단 서열과 다른 세균에서 기존에 보고된 서열을 바탕으로 합성된 degenerate primer와 nested primer를 이용하여 PCR을 실시하고 전기영동으로 확인한 결과, 770 bp의 부위에서 뚜렷한 DNA 단편이 관찰되었다(Fig. 3). 획득된 770 bp DNA 단편의 *SmOK5nrI* 유전자

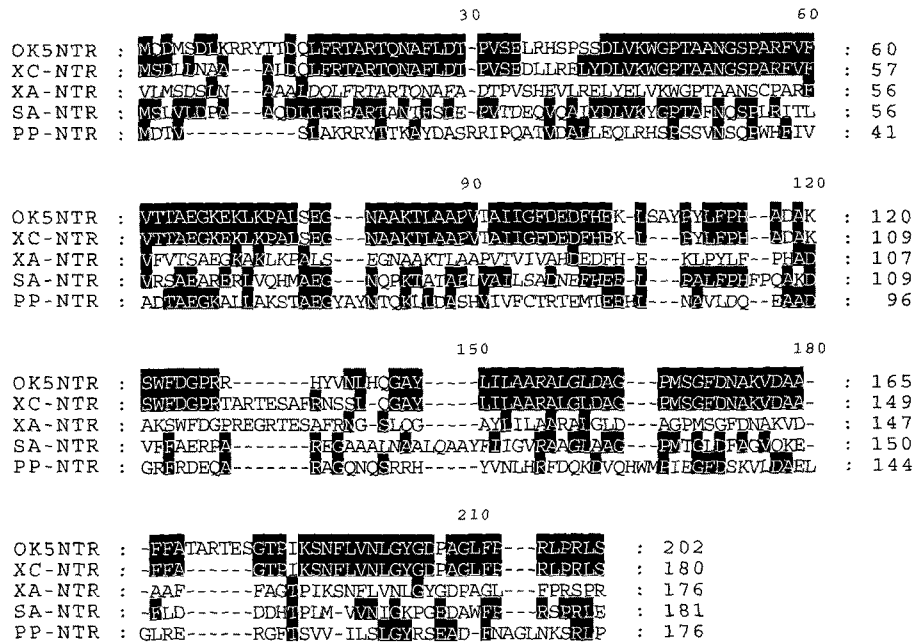


**Fig. 2.** PCR products of nitroreductase gene from *Stenotrophomonas* sp. OK-5. Lanes: M, molecular size marker; 1, PCR product amplified with emNRO101 and emNRO102 primers, 2, 770-bp PCR product amplified with emNRO1 and emNRO102.

**Table 3.** Degenerate primers for amplification of *SmOK5nrI*

Oligomer name	Degenerate primer sequence
emNRO101	5'-ATG ACN(A/T/G/C) GAY(C/T) Y(C/T)TA Y(C/T)TG AAN(A/T/G/C) GCT
emNRO1	5'-TTY(C/T) M(A/C)GA ACY(C/T) GCW(A/T) CGW(A/T) GAY(C/T) CGA
emNRO102	5'-M(A/C) K(G/T)C GAW(A/T) R(A/G)CG TGC S(C/G) TTC GTC <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Represents sequence of the antisense strand



**Fig. 3.** Alignment of deduced amino acid sequences of nitroreductase. OK5NTR: sequence of NTR fraction I from *Stenotrophomonas* sp. OK-5, XC-NTR: sequence of NTR from *Xanthomonas campestris*, XA-NTR: sequence of NTR from *X. axonopodis*, SA-NTR: sequence of NTR from *Streptomyces avermitilis*, PP-NTR: sequence of NTR from *P. putida* KT2440.

서열을 분석하기 위하여 0.8% agarose gel로부터 DNA 단편을 회수하고 pBluescriptIIKS+ vector에 subcloning하였다. Subcloning된 *SmOK5nr1* 유전자 서열을 조사하기 위하여 emNRON-1과 M13 primer를 이용하여 자동염기서열 분석기를 통한 분석을 실시하여 *SmOK5nr1* 유전자의 ORF를 포함하는 631 bp의 정확한 염기서열을 얻을 수 있었으며, 유추되는 아미노산 서열로부터 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 상동성을 조사한 결과, *Xanthomonas campestris* (81%), *X. axonopodis* (75%), *Streptomyces avermitilis* (30%), *P. putida* KT2440 (*pnrB*) (16%)에서 상동성이 존재함을 확인하였다(Fig. 4). Koder 등(15)은 *E. cloacae*에서 NTR을 암호하는 염기서열을 분석하고 상동성을 조사하여 *E. coli*의 NfsA와 87%로 유사함을 확인하였다. 본 연구에서 얻어진 OK-5의 NTR은 *Xanthomonas* 속(genus)의 NTR과 특히 유사성이 높은 것으로 나타났다.

향후, 균주 *Stenotrophomonas* sp. OK-5로부터 cDNA library를 제작하여 NTR 유전자를 가지는 다수의 clone을 확보하고, NTR 유전자의 promoter를 분석하여 균주 OK-5에서 자가 및 외래 유전자의 발현에 대한 연구가 진행될 것이다.

### 참고문헌

- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemical environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Bleher, D.S., K.L. Knoke, B.G. Fox, and G.H. Chambliss. 1997. Regioselectivity of nitroglycerin denitration by flavoprotein nitroester reductases purified from two *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 179, 6912-6920.
- Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Protein method. 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., 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.
- Brunmark, A., E. Cadenas, A.J. Segura, C. Lind, and L. Ernster. 1988. DT-diaphorase catalyzed two-electron reduction of various *p*-benzoquinone- and 1,4-naphthoquinone epoxides. *Free Radic. Biol. Med.* 5, 133-143.
- Bryant, C., and M. DeLuca. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H-nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266, 4123-4130.
- Bryant, C., L. Hubbard, and W.D. McElroy. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266, 4126-4130.
- Burns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T.C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K. H. Blotvogel, and D. Gemsa. 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1676-1679.
- French, C.E., S. Nicklin, and N.C. Bruce. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2864-2868.
- Funk, S.B., D.J. Roberts, D.L. Crawford, and R.L. Crawford. 1993. Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2171-2177.
- Gorontzy, T., O. Drzyzga, M.W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Loew, and K.H. Blotvogel. 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 265-284.
- Hecht, H.J., H. Erdmann, H.J. Park, M. Sprinzl, and R.D. Schmid

1995. Crystal structure of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1109-1114.
13. Ho, E.M., J.W. Chun, H.Y. Kahng, and K.H. Oh. 2003. Characterization of NAD(P)H-nitroreductase purified from the TNT-degrading bacterium, *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Kor. J. Microbiol.* 39, 223-229.
  14. Kobori, T., H. Sasaki, W.C. Lee, S. Zenno, K. Saigo, M.E. Murphy, and M. Tanikura. 2001. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *J. Biol. Chem.* 276, 2816-2823.
  15. Koder, R.L., and A.-F. Miller. 1998. Overexpression, isotopic labeling, and spectral characterization of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Protein Expression & Purification* 13, 53-60.
  16. McFarlan, S. 2000. 2,4,6-Trinitrotoluene metabolism pathway map. University of Minnesota biocatalysis/biodegradation database.
  17. Nivinskas, H., R.L. Koder, Z. Anusevičius, J. Šarlauskas, A.-F. Miller, and N. Èenas. 2000. Two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H nitroreductase: description of quantitative structure-activity relationships. *Biochem. Pol. Acta* 47, 941-949.
  18. Nivinskas, H., R.L. Koder, Z. Anusevičius, J. Šarlauskas, A.-F. Miller, and N. Èenas. 2001. Quantitative structure-activity relationships in two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H:nitroreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 170-178.
  19. Nokhbeh, M.R., S. Boroumandi, N. Pokorny, P. Koziarz, E.S. Paterson, and I. B. Lambert. 2002. Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar typhimurium TA1535. *Mutat. Res.* 508, 59-70.
  20. Oh, B. T., G. Sarath, P.J. Shea, R.A. Drijber, and S.D. Comfort. 2000. Rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene in a *Pseudomonas* enzyme assay. *J. Microbiol. Methods* 42, 149-158.
  21. Riefler, R.G., and B.F. Smets. 2000. Enzymatic reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroarenes: kinetics linked to one-electron redox potentials. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3900-3906.
  22. Riefler, R.G., and B.F. Smets. 2002. NAD(P)H:Flavin mononucleotide oxidoreductase inactivation during 2,4,6-trinitrotoluene reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1690-1696.
  23. Spain, J.C. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 523-555.
  24. Wang, C.-J., S. Thiele, and J.-M. Bollag. 2002. Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 1-8.
  25. Watanabe, M., M. Ishidate, Jr., and T. Nohmi. 1990. Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 1059.
  26. Whiteway, J., P. Koziarz, J. Veall, N. Sandhu, P. Kumar, B. Hoehner, and I. B. Lambert. 1998. Oxygen-insensitive nitroreductase: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofur derivatives in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 5529-5539.

(Received August 2, 2004/Accepted September 7, 2004)

---

**ABSTRACT : Physiological and Molecular Characterization of NAD(P)H-Nitroreductase from *Stenotrophomonas* sp. OK-5**

**Eun-Mi Ho, Hyung-Yeel Kahng<sup>1</sup>, and Kye-Heon Oh\*** (Department of Life Science, Soonchunghyang University, P.O. Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea, <sup>1</sup>Department of Environmental Education, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea)

*Stenotrophomonas* sp. OK-5 capable of degrading TNT has been found to have three nitroreductase fractions designated as NTR fractions I, II, and III. NTR in a previous study. This study was attempted to reveal physiological and molecular characteristics of NTR fractions I, II, and III in strain OK-5. Several chemicals (*e.g.*, EDTA, NaCl, dithiothreitol,  $\beta$ -mercaptoethanol) were tested for their effect on enzyme activity of NTRs, demonstrating that enzyme activities of NTR fractions I, II, and III from OK-5 were inhibited in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol. Substrate specificity test showed that NTR fractions I, II, and III all have over 70% enzyme activities for nitrobenzene or RDX as a substrate. N-terminal amino acid sequence of NTR fraction I from *Stenotrophomonas* sp. OK-5 was <sup>1</sup>MSDLLNADAVVQLFRTARDS<sup>20</sup> and exhibited 70% sequence homology with that of NTR from *Xanthomonas campestris*. NTR I gene from *Stenotrophomonas* sp. OK-5 (*SmOK5nrI*) shared extensive sequence homology in deduced amino acid sequence of PCR product with NTRs from *Xanthomonas campestris* (81%), *X. axonopodis* (75%), *Streptomyces avermitilis* (30%), whereas they had low homology with that from *P. putida* KT2440 (*pnrB*) (16%).