

## Aniline 분해균주 *Burkholderia* sp. HY1과 *Delftia* sp. HY99에서 유래된 Aniline Dioxygenases 유전자의 비교 분석

강형일\* · 오계현<sup>1</sup>

순천대학교 환경교육과, <sup>1</sup>순천향대학교 생명과학부

**Comparative Analysis of Aniline Dioxygenase Genes from Aniline Degrading Bacteria, *Burkholderia* sp. HY1 and *Delftia* sp. HY99.** Kahng, Hyung-Yeol\* and Kye-Heon Oh<sup>1</sup>. Department of Environmental Education, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea, and Department of Life Science, <sup>1</sup>Soonchunhyang University, P.O. BOX 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea – In this study, aniline dioxygenase genes responsible for initial catabolism of aniline in *Burkholderia* sp. HY1 and *Delftia* sp. HY99 were cloned and the amino acid sequences were comparatively analyzed, which already have been reported as bacteria utilizing aniline as a sole source of carbon and nitrogen, *B. sp.* HY1 was found to have at least a plasmid, and the plasmid-cured strain, *B. sp.* HY1-PC obtained using mitomycin C was tested with wild type strain to investigate whether the former maintained the degradability for aniline. This proved that the aniline oxygenase gene from *B. sp.* HY1 was located in chromosomal DNA, not in plasmid DNA. Aniline dioxygenase small subunits from *B. sp.* HY1 and *D. sp.* HY99 were found, based on 146 amino acids, to share 79% similarity. Notably, *ado2* genes from *B. sp.* HY1 and *D. sp.* HY99 which were found to be terminal dioxygenase of aniline dioxygenase small subunit showed 99% similarity in the deduced amino acid sequences with *tdnA2* of *Frateruia* sp. ANA-18 and *danA2* of *D. sp.* AN3, respectively. Besides, enzyme assay and amino acid sequence analysis of catechol dioxygenase supported the previous report that *B. sp.* HY1 might occupy *ortho*-cleavage pathway using catechol 1,2-dioxygenase, while *D. sp.* HY99 might occupy catechol 2,3-dioxygenase for *meta*-cleavage pathway.

**Key words:** Aniline dioxygenase, *Burkholderia* sp. HY1, *Delftia* sp. HY99

### 서 론

Aniline은 염료나 플라스틱, 그리고 제초제, 살충제 등의 농약을 생산하는데 사용되며 토양환경과 수환경으로 방출되는 양이 매년 증가하여 심각한 환경오염원으로 간주되고 있다[2, 7]. Aniline은 NH<sub>2</sub>로 치환되어 있는 단일환의 방향족화합물로서 미생물들에게는 탄소원과 질소원으로 동시에 사용될 수 있는 비교적 간단한 구조의 화학물질이지만 자연 상태에서 아조벤젠(azobenzene)이나 니트로벤젠(nitrobenzene), 그리고 트리아젠(triazene)과 같은 난분해성 물질로 전환할 수 있는 능력 때문에 심각한 환경문제를 야기 시켜왔다[10, 17]. 따라서 aniline은 환경미생물학자들로부터 오랫동안 관심의 대상이 되어 온 화학물질로 aniline의 미생물학적 분해와 관련된 연구가 상당히 깊게 진행되어 왔다[1-9, 13-15, 18]. 최근, 유전자 클로닝에 의해 aniline 분해에 관련된 전체 혹은 부분 유전자가 규명됨으로써 *Acinetobacter* sp. strain YAA[5], *Delftia tsuruhatensis* AD9[14], *Frateruia*

sp. ANA-18[18], 그리고 *Pseudomonas putida* UCC22[4] 등 여러 균주에서 aniline 분해 기작이 자세히 밝혀지기 시작하였다. 유전자 수준에서의 활발한 연구를 통한 aniline 분해 유전자의 다양성에 대한 정보와 자료 확보는 서식환경이 다른 균주들로부터 유래된 aniline dioxygenase 간의 계통관계를 결정하는데 중요한 토대를 제공하고 있다.

본 연구팀은 이전 연구를 통하여 강력하게 aniline을 분해할 수 있는 우수한 미생물들을 분리하여 그 특성을 보고한 바 있다[7-9]. 최근 분리된 aniline 분해세균 중 선별된 두 균주, *Burkholderia* sp. HY1과 *Delftia* sp. HY99은 호기적 조건에서 aniline을 catechol로 전환할 수 있는 반면, 혐기적 조건에서는 *D. sp.* HY99만이 aniline을 *p*-aminobenzoate로 전환할 수 있는 능력을 갖고 있다[7, 8]. 특히 *Delftia* 속(genus)에 속하는 균들에 의한 aniline 분해에 관한 연구가 여러 나라 많은 연구자들에 의해 보고되고 있음은 주목할 만 하며[1, 7, 9, 13-14, 23], *Burkholderia* sp.에 의한 aniline 분해유전자에 대한 보고는 아직 이루어진 바가 없는 것으로 파악되고 있다.

본 연구에서는 aniline 분해과정에서 환경조건에 따라 분해과정에 차이를 나타내는 선별된 두 균주, *B. sp.* HY1과 *D. sp.* HY99로부터 aniline의 첫 번째 분해 단계에 관여하

\*Corresponding author

Tel: 82-61-750-3385, Fax: 82-61-750-3385

E-mail: kahng@sunchon.ac.kr

는 aniline dioxygenase 유전자의 DNA 및 아미노산서열을 비교하였고, 기존 연구에서 제안된 aniline 분해산물인 catechol의 추정경로[7, 8]를 유전자 수준에서 확인하기 위하여 catechol dioxygenase의 아미노산 서열 분석을 부가적으로 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양 조건

본 연구에서 aniline 분해유전자를 분석대상 균주로 이전 연구를 통하여 다른 조건에서 aniline을 강력하게 분해할 수 있는 것으로 보고된 *Bukholderia* sp. HY1[8]과 *Delftia* sp. HY99[7]를 사용하였고, 유전자 클로닝 및 분석을 위해서는 *E. coli* JM109를 사용하였다. 사용된 최소배지는 증류수 1 L 당 1 g  $K_2HPO_4$ , 1 g  $KH_2PO_4$ , 0.41 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02 g  $CaCO_3$ 에 단일 탄소원 및 질소원으로 1 g의 aniline을 포함하는 무기배지를 사용하였다. Aniline 액체배지에 접종된 두 균주는 모두 30°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였으며, 필요에 따라 고체배지를 사용하였다. 유전자 클로닝을 위해 *E. coli* JM109를 사용할 때는 Luria-Bertani(LB) (Difco, Sparks, USA)배지에서 균주를 배양하였고, 형질전환체의 선별을 위해서는 ampicillin 100 µg/ml를 LB 태지에 첨가하여 사용하였다. 그 밖에 언급되지 않은 배양 방법은 이전 연구에서 사용한 방법에 따라 연구를 수행하였다[8]. 본 연구에서 구입처가 언급되지 않은 제품을 제외한 aniline과 항생제 등 모든 제품은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

### Aniline 배양액 및 순수분리 균주의 dioxygenase 유전자 분석

제주의 한 과수원의 토양시료 10 g을 1 mM aniline이 포함된 최소배지에서 넣어 1달 이상 장기간 배양하면서 1주일 간격으로 10 ml를 취하여 3 mM의 농도로 aniline이 첨가된 최소배지에서 aniline 농화배양액을 유지하였다. 이들 혼합 배양액과 순수 분리된 균주 HY1과 HY99으로부터 얻은 genomic DNA를 사용하여 total genomic DNA와 dioxygenase 유전자에서 가장 잘 보존된 Rieske iron-sulfur motif에 기초하여 만들어진 degenerate oligonucleotide primers를 사용하여 분해유전자를 조사하였고, PCR 조건과 dioxygenase 유전자의 분석은 이미 알려진 방법에 따라 수행하였다[11].

### Total genomic DNA 분리와 정제

*Bukholderia* sp. HY1과 *Delftia* sp. HY99을 50 ml의 LB 배지에 접종하고 30°C에서 180 rpm으로 24시간 동안 배양한 후 원심분리(6,300 × g, 10 min, 4°C)하여 세포를 수확하였다. 회수된 배양세포를 5 ml TES buffer [0.1 M Tris-HCl(pH 7.0), 0.01 M EDTA, 1 M NaCl]로 재현탁하

고, lysozyme(10 mg/ml)을 200 µL 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 10% SDS를 100 µL 첨가하고, 물리적인 DNA 절단을 방지하기 위하여 천천히 섞어준 후 50 µL proteinase K(20 mg/ml)와 5 µL RNase를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 5 ml TES buffer를 더 첨가하고 10 ml의 phenol을 첨가하여 잘 섞어주었다. 원심분리를 통하여 얻어진 상징액을 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol로 2회, chloroform으로 1회 처리하였다. 상징액을 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 1/10 volume의 3M sodium acetate(pH 5.4)와 2-3 volume의 100% ethanol을 첨가하여 30분간 실온에서 방치하였다. 원심분리 후 상징액을 버리고, 70% ethanol을 처리하여 염류를 씻어낸 후, 다시 한번 원심분리하였다. 상징액을 버리고 공기 중에서 ethanol을 제거한 후, 침전물을 500 µL의 멸균수에 녹여 다음 실험에 사용하였다. 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하여 DNA band를 확인한 후 UV-spectrophotometer(DU 800, Beckman Coulter, Fullerton, USA)를 이용하여 정량하였다. Total DNA의 정제를 위해 crude DNA를 10 ml cesium chloride용액에서 녹인 후 ethidium bromide를 첨가하고 102,200 × g에서 20시간 동안 초원심분리하였다. 초원심분리 후 total genomic DNA band를 회수하고 cesium chloride와 ethidium bromide를 제거하기 위하여 0.02 µm membrane filter를 이용하여 30분간 투석하여 DNA 용액을 회수하여 농축한 후 특정 유전자를 증폭하기 위한 시료로 사용하였다.

### 플라스미드 Curing

*Bukholderia* sp. HY1의 플라스미드가 aniline 분해에 관련된 유전자를 갖고 있는지를 규명하기 위하여 기존 방법[20]의 방법에 따라 플라스미드 curing 실험을 수행하였다. HY1 균주를 LB 액체배지에서 12시간 진탕배양하고 이 배양액 100 µL를 취하여 여러 농도(10-90 µg/ml)의 mitomycin C(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)가 첨가된 LB 액체 배지에 다시 접종하여 48시간 동안 배양하였다. 이 배양액 중 균주의 성장을 억제하지 않은 최대농도의 mitomycin C(90 µg/ml)가 첨가된 배지를 선택하여 회석한 후 LB 고체배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 콜로니를 LB 고체배지와 aniline 배지에 replica 법[12]으로 접종한 후 aniline 분해능을 상실한 후보균주와 분해능을 유지하고 있는 후보균주들을 각 10개씩 선별하여 total genomic DNA를 분리한 후 1% agarose gel상에서 플라스미드 존재여부를 확인하였다.

### Aniline과 catechol oxygenase 활성도 측정

Aniline 및 catechol oxygenase 활성은 본 연구가 진행되는 동안 사용한 균주가 aniline 분해를 유지하고 있는지를 확인하기 위하여 필요에 따라 수행하였다. Aniline 및 catechol

활성도 측정을 위해서 각 균주는 pH 7.0의 aniline 최소배지에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 수확한 후 40 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 세 번 세척한 후, 1 mM의 aniline이 포함된 10 ml의 40 mM phosphate buffer가 담긴 용액에 O.D.값이 1.0이 되도록 옮겼다. 1 ml 시료를 4 시간대와 24시간대에서 취한 후 이미 알려진 방법에 따라 HPLC(Shimadzu, Tokyo, Japan)로 분석하였다[8]. Aniline oxygenase 활성은 aniline 농도의 감소율로 결정하였다. 플라스미드가 제거된 균주에 의한 aniline 분해 산물인 catechol의 분해능을 측정하였다. Catechol oxygenase 활성은 두 개의 다른 catechol 분해경로에 관여하는 효소의 특성에 따라 그 방법을 달리하였다. Catechol 1,2-dioxygenase 활성은 Aoki 방법[3]에 따라 결정하였고, catechol 2,3-dioxygenase 활성은 Nozaki 방법[19]에 따라 수행하였다.

#### Aniline dioxygenase primer 제작 및 PCR 증폭

선별된 균주의 aniline dioxygenase를 분석하기 위하여 *Acinetobacter* sp. YAA의  $\alpha$ 와  $\beta$  subunit를 기준으로, *Pseudomonas putida* UCC22의 *tdnA1*과 *tdnA2* 유전자 정보를 근거로 가장 잘 보존된 부위를 선별하여 두 set의 PCR 용 primer를 제작하였다(Table 1). 제작된 primer 중 ADOLU와 ADOLL은 aniline dioxygenase의 large subunit의 유전자를 증폭하기 위하여 사용되었고, ADOSU, ADOSL은 small subunit의 유전자를 증폭하기 위하여 사용하였다. 필요에 따라, 두 set의 primer를 혼용하여 PCR 과정을 수행하였다. PCR 조건은 50 ng 농도의 DNA를 주형으로 사용하고 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 주기로 33번 순환한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 반응을 수행하였다. 1% agarose gel에서 전기영동하여 예상되는 DNA 증폭산물을 확인하고, aniline dioxygenase library를 만드는 데 사용하였다. 부가적으로 aniline 분해산물인 catechol의 대사경로에 관련된 유전자를 분석하기 위하여 두 세트의 primer, C12OU(5'-GAV BKS TGG CAC GCS RA)와 C12OL(5'AWG TWD ADC TGS GTG GTS SA), 그리고

**Table 1. Degenerate primers used for the detection of aniline dioxygenase in this study.**

Primers	Oligonucleotide sequences	Source
Large subunit		
ADOLU	5'-CYT ACC AYG GYT GGM RWT TC	
ADOLL	5'-CAT MAY YGG RAA ATC CTC CTG RG	
Small subunit		
ADOSU	5'-GAG SCK GCG CKT GAK CRC RAS AT	
ADOSL	5'-GTC GWT YAR ATT KAY CTG	

Degenerate primers was designed based on the consensus sequences of a and  $\beta$  subunits of *Acinetobacter* sp. YAA, and *tdnA1* and *tdnA2* of *Pseudomonas putida* UCC22. The expected sizes of PCR products were approx. 770-bp for ADOLU-ADOLL, approx. 490-bp for ADOSU-ADOSL, and approx. 1600-bp for ADOLU-ADOSL.

C23OU(5'-CAA YCC SGA BSY DTG GC)와 C23OL(5'-TCR AAR AAR TAR AYB GTC)를 자체작하여 aniline dioxygenase와 같은 조건으로 사용하였다.

#### 재조합 DNA 조립, 형질전환 및 염기서열 분석

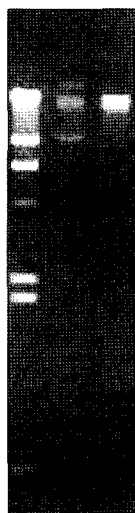
*Burkholderia* sp. HY1과 *Delftia* sp. HY99로부터 유래된 PCR산물을 pGEM-T vector(Promega, Madison, USA)에 ligation한 후 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 형질전환된 clone 중 각각 5개를 임의적으로 선별한 후 T7 promoter primer나 SP6 promoter primer를 이용하여 양방향으로 DNA sequencing을 수행하였다. DNA sequencing은 ABI 377 자동염기서열 분석기(Applied Biosystem, Foster, USA)를 사용하였다. 기타 언급하지 않은 것은 Sambrook 등의 방법[22]에 따라 수행하였다. 밝혀진 염기서열에 대한 분석은 DNA Star의 Lasergene program(DNA Star, Madison, USA)과 GenBank의 blast search의 database를 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여 이미 알려진 방법에 따라 수행하였으며[8], 본 연구에서 결정된 *B. sp.* HY1 및 *D. sp.* HY99의 aniline dioxygenase의 염기서열은 각각 Accession No. ET564189, ET564190으로 GenBank에 등록되었다.

#### 결과 및 고찰

##### 플라스미드 curing에 의한 aniline 및 catechol dioxygenase 유전자의 위치 추적

Total genomic DNA를 분리하여 0.8% agarose gel상에서 전기영동하였을 때 *Burkholderia* sp. HY1은 최소 1개의 플라스미드를 가지고 있음이 확인되었다(Fig. 1). 그렇지만, *Delftia* sp. HY99은 플라스미드를 갖고 있지 않은 것으로 확인되었다. 플라스미드가 제거된 *B. sp.* HY1-PC와 야생형 *B. sp.* HY1의 aniline 분해능과 catechol oxygenase 활성을 측정 한 결과, *B. sp.* HY1-PC는 aniline 분해능 및 catechol oxygenase 활성을 상실하지 않은 것으로 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 *B. sp.* HY1 균주에서 aniline 분해유전자는 플라스미드가 아닌 염색체 DNA에 존재함을 제시해준다.

또한, aniline 분해 산물인 catechol의 분해 경로를 유전자 수준에서 추적하기 위하여 위 두 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고 본 연구에서 자체 제작된 catechol dioxygenase 1,2- 및 2,3-dioxygenase 유전자 증폭용 degenerate primer, C12OU-C12OL과 C23OU-C23OL을 세트로 사용하여 각각 약 270-bp와 400-bp의 증폭된 유전자 산물을 얻었다(자료 미제시). 이들 유전자의 염기서열에 대한 분석결과, *B. sp.* HY1로부터 얻어진 유전자는 catechol 1,2-dioxygenase로 아미노산 서열 기준에 의하여 기존의 *Frateuria* sp. ANA-18의 catechol 1,2-dioxygenase의 CatA2와 99%의 상동성을 나타낸 반면 *D. sp.* HY99로부터 얻어진 유전자 산물은 기

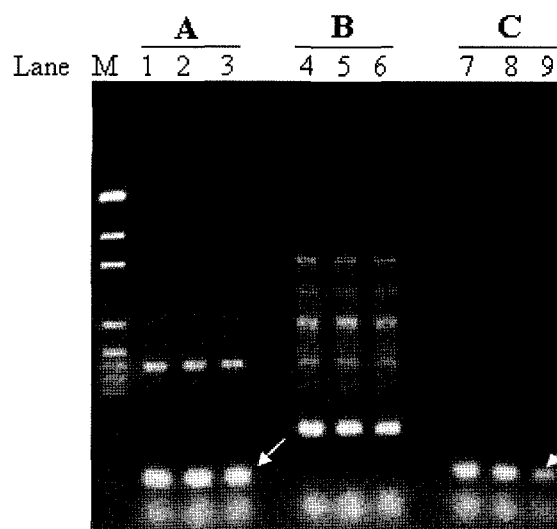


**Fig. 1.** Total genomic and plasmid DNA profile from *Burkholderia* sp. HY1. Lane M,  $\lambda$ -HindIII size marker; lane 1, total genomic DNA including plasmid from wild type strain; 2, total genomic DNA from the plasmid-cured strain.

존의 *D. acidovorans* strain 7N[23]에서 밝혀진 catechol 2,3-dioxygenase와 99% 이상의 상동성을 갖는 것으로 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 aniline의 첫 번째 및 두 번째 분해단계에 관련된 aniline dioxygenase와 catechol dioxygenase 유전자의 위치가 모두 염색체 DNA에 위치하고 있음을 지지해 주며, catechol 활성 실험을 통해 *B. sp. HY1*과 *D. sp. HY99*에서 catechol의 대사는 각각 *ortho*-cleavage pathway와 *meta*-cleavage pathway를 통해 이루어질 것으로 제시한 이전 보고[7, 8]를 강력하게 뒷받침해주었다.

#### Aniline 농화배양에 따른 방향족 화합물 분해유전자, dioxygenase의 변화 추이

농화배양으로부터 분리한 세균 군집의 genomic DNA와 Rieske iron-sulfur motif에 기초하여 만들어진 degenerate oligonucleotide primers를 사용한 PCR 기법[11]에 의하여 dioxygenase 유전자를 증폭한 후 1% agarose gel상에 전기영동한 패턴을 나타내었다(Fig. 2). Lane 1-3과 4-6은 각각 4주 배양된 *Burkholderia* sp. HY1과 *Delftia* sp. HY99세포



**Fig. 2.** A profile of amplified aniline dioxygenase genes in bacteria isolated from aniline-enriched culture. The bold letters, A, B and C indicate *B. sp. HY1*, *D. sp. HY99* and a mixed culture, respectively. Lane M, pGEM size marker; lanes 1-3, PCR products using three different concentrations (10ng, 25ng and 50ng) of genomic DNA from *B. sp. HY1*; lanes 4-6, PCR products from *D. sp. HY99* using the same concentrations with those of *B. sp. HY1*; lane 7-9, PCR products from an aniline-enriched mixed culture using the same concentrations of total genomic DNA with those of *B. sp. HY1*. The arrows indicate the dioxygenases amplified as expected.

로부터 분리된 genomic DNA를 사용하여 증폭된 dioxygenase의 전기영동 패턴으로 *B. sp. HY1*에서는 예상된 약 80-bp 크기의 유전자 증폭산물을 얻었다. 그러나 *D. sp. HY99*에서는 예상보다 훨씬 큰 약 220-bp 크기의 유전자 증폭산물을 얻었다. lane 7-9는 농화배양 0시간대에서 수확된 전체 세포의 genomic DNA를 사용하여 증폭된 dioxygenase의 전기영동 패턴으로 예상했던 크기의 한 종류의 DNA band 패턴만을 보여주었다. *B. sp. HY1*과 농화배양 세포로부터 dioxygenase일 것으로 추측되는 유전자 band만을 회수하여 제조한 dioxygenase 유전자 library로부터 얻어진 30 클론에 대한 염기서열을 결정된 결과, 분석된 dioxygenase는 모두 Rieske iron-sulfur motif을 갖는 다환성 방향족 화

**Table 2.** Specific activities or the identified amino acid sequences of catechol dioxygenases in cell-free extracts of *Burkholderia* sp. HY1, the plasmid-cured strain, *Burkholderia* sp. HY1-PC, and *Delftia* sp. HY99.

Strains	Activities (U/mg)		ID sequences (Accession No.)	A.A. Similarity (%)
	C12O	C23O		
<i>B. sp. HY1</i>	0.459	0.000	C12O (Accession No. EF570448)	99 with Cat2 from <i>F. sp. ANA-18</i>
<i>B. sp. HY1-PC</i>	0.428	0.000	ND	ND
<i>D. sp. HY99</i>	0.000	0.427	C23O (Accession No. EF570449)	99 with C12O from <i>D. acidovorans</i> 7N

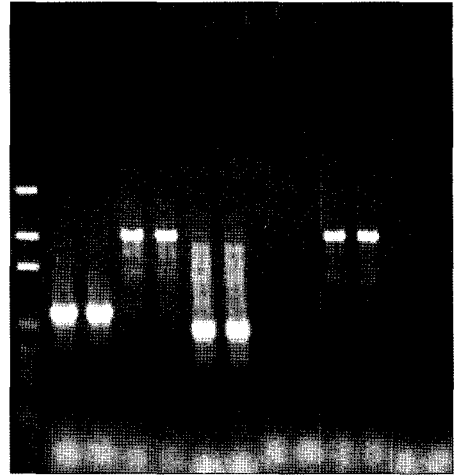
Specific activities were given in units per milligram of protein. 1U represents the conversion of 1  $\mu$ mol substrate per minute at 24. Catechol dioxygenase activity was measured to check whether wild-type strain and the cured strain maintained the biodegradability of catechol which was assumed to be produced from aniline degradation. ND, not tested. Catechol oxygenase sequences from both strains were deposited in GenBank as indicated accession numbers.

합물 분해에 관련된 유전자였으나 aniline dioxygenase 유전자의 존재를 탐색하지는 못하였다(자료 미제시). 또한 *D. sp. HY99*로부터 증폭된 약 400-bp의 유전자 산물을 회수하여 분석한 결과, biphenyl과 naphthalene 분해에 관련된 효소를 포함하고 있었으나 aniline dioxygenase를 찾지는 못하였다. *B. sp. HY1*과 *D. sp. HY99*가 aniline을 강력하게 분해함에도 불구하고 Rieske iron-sulfur motif에 기초하여 만들어진 universal degenerate oligonucleotide primers를 이용하여 얻어진 증폭산물에서 aniline dioxygenase를 찾지 못한 결과는 이 primer가 aniline dioxygenase만을 목표로 하는 것이 아니어서 다양한 종류의 dioxygenase가 증폭되었고 여러 가지가 혼합된 이 유전자 band를 회수하여 dioxygenase clonal library를 만들어서 제한된 클론만을 분석하였기 때문에 나타날 수 있는 가능성이 매우 큰 것으로 여겨진다. 실제로 aniline dioxygenase만을 목표로 하는 primer를 사용하여 얻어진 유전자 산물의 경우 aniline dioxygenase 유전자를 이들 두 균주가 갖고 있음을 확인시켜 주었다는 점에서 그와 같은 가능성이 매우 높음을 제시해 주고 있다. 또한 이러한 결과는 이들 두 균주가 aniline이외에 naphthalene 등 다른 방향족 화합물을 분해할 수 있는 능력을 갖고 있음을 제시해준다.

#### *Burkholderia sp. HY1* 및 *Delftia sp. HY99* 유래 aniline oxygenase 유전자 증폭 및 염기서열 결정

Dioxygenase 유전자 분석을 통하여 aniline oxygenase 유전자의 존재가 확인되지 않았으나, aniline 분해능 및 catechol 활성을 갖고 있는 것으로 확인된 *Burkholderia sp. HY1*과 *Delftia sp. HY99*의 genomic DNA와 aniline oxygenase를 표적으로 하여 제작된 primer를 사용하여 aniline 분해에 관련된 유전자를 증폭하였다(Fig. 3). Fig. 3에서, lane 1-2는 aniline dioxygenase의 large subunit 표적용 primer인 ADOLU-ADOLL을 한 세트로 사용하여 *B. sp. HY1* genomic DNA로부터 약 800-bp의 유전자 증폭산물을 얻은 것이다. Lane 3-4는 aniline dioxygenase large subunit 일부와 small subunit 일부를 표적으로 하여 제작된 primer, ADOLU-ADOSL을 한 세트로 사용하여 *B. sp. HY1* genomic DNA로부터 약 1,600-bp의 유전자 증폭산물을 얻은 것이다. Lane 5-6은 aniline dioxygenase small subunit를 표적으로 하여 제작된 primer, ADOSU-ADOSL을 한 세트로 사용하여 *B. sp. HY1* genomic DNA로부터 약 500-bp의 유전자 증폭산물을 얻은 것이다. *D. sp. HY99* 균주에 대해서도 같은 방식으로 aniline oxygenase 유전자를 증폭하였으며, *B. sp. HY1*에서 유사한 결과를 얻었으나 aniline dioxygenase large subunit와 small subunit 자체만을 표적으로 한 경우 증폭 산물인 DNA band의 강도는 매우 약하게 나타났다. 그렇지만 large와 small subunit를 동시에 표적으로 삼은 ADOLU-ADOSL primer의 경우 *B. sp.*

Lane M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Fig. 3.** PCR amplification of aniline dioxygenase genes from *Burkholderia sp. HY1* and *Delftia sp. HY99*. Lane M,  $\lambda$ -HindIII size marker; lane 1-2, ADOLU-ADOLL with HY1 DNA; lane 3-4, ADOLU-ADOSL with HY1 DNA; lane 5-6, ADOSU-ADOSL with HY1 DNA; lane 7-8, ADOLU-ADOLL with HY99 DNA; lane 9-10, ADOLU-ADOSL with HY99 DNA; lane 11-12, ADOSU-ADOSL with HY99 DNA

*HY1*에서처럼 예상한 크기의 진한 DNA band를 얻을 수 있었으며, 이를 agarose gel로부터 회수하여 클로닝한 후 염기서열을 결정하였다. 결정된 aniline oxygenase 염기서열 중 두 균 간의 상호비교가 가능한 부분의 염기서열 436 bp를 선택하여, 이로부터 번역된 146개의 아미노산 서열을 기준으로 가장 높은 유사성을 나타낸 균주 *Frateria sp. ANA-18* 및 *D. sp. AN3*와 multialignment을 수행하였다(Fig. 4). 아미노산 서열의 비교분석을 통해 *B. sp. HY1*과 *D. sp. HY99* 유래 aniline dioxygenase subunit는 약 79%의 상동성을 나타내었다.

#### *Burkholderia sp. HY1* 및 *Delftia sp. HY99* 유래 aniline oxygenase 분석

*Burkholderia sp. HY1* 및 *Delftia sp. HY99* 유래 aniline dioxygenase의 계통관계를 알아보기 위하여 현재까지 여러 균에서 밝혀져 있는 aniline dioxygenase small subunit의 아미노산 서열과 비교하였다. 본 연구에서는 *B. sp. HY1*과 *D. sp. HY99* 두 균주와 *Frateria sp. ANA-18*, *Pseudomonas putida* UCC22, *Delftia sp. AN3*, *Acinetobacter sp. GXA7* (Accession no. AY877266.1), *Acinetobacter sp. YAA* 등 aniline 분해균주, 그리고 *Nocardioides sp. JS614*와 *Bradyrhizobium sp. BTAi1* 등 선별한 7개 균주를 대상으로 하여 대상균주 모두에서 밝혀져 있는 128개의 아미노산을 대상으로 비교분석한 결과, *B. sp. HY1*와 *D. sp. HY99* 사이에는 약 81%의 상동성이 있음을 보여주었다. *B. sp. HY1*에서 밝혀진 aniline dioxygenase small subunit인 *ado2*는

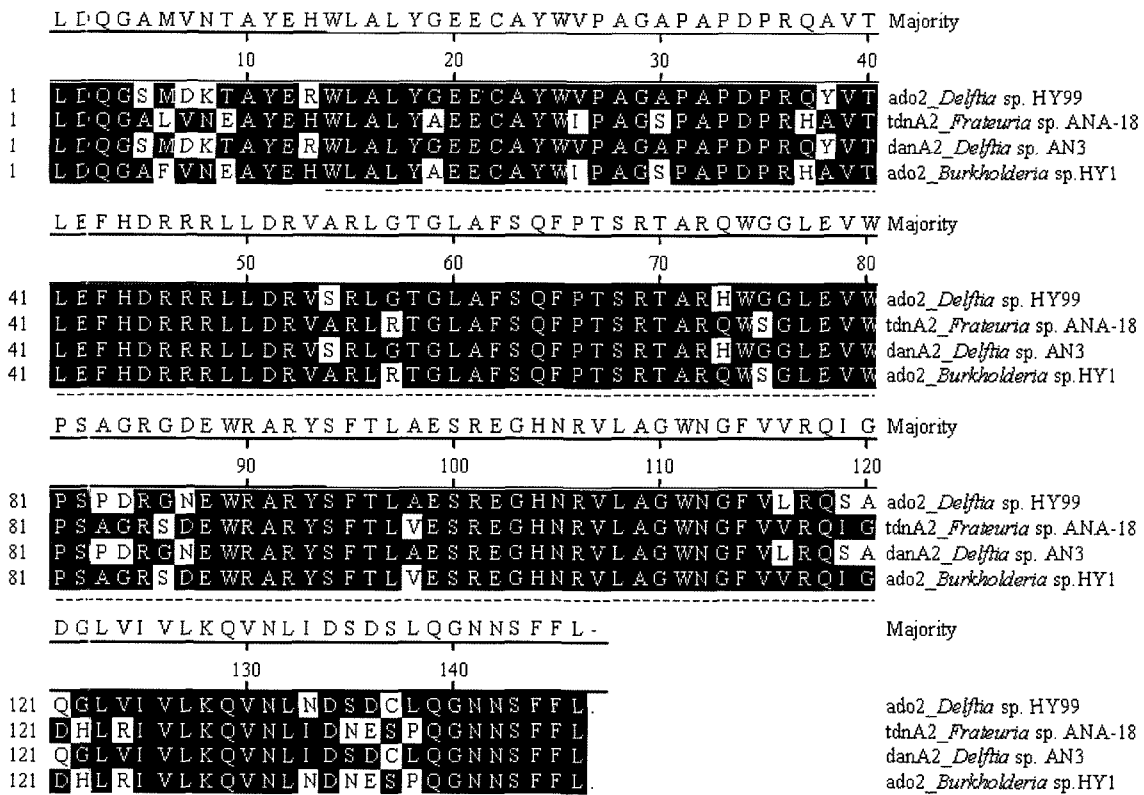


Fig. 4. Mutiple alignment of deduced amino acid sequences of aniline dioxygenase genes from *Burkholderia* sp. HY1 and *Delftia* sp. HY99 with those identified in other aniline-degrading bacteria previously reported. The amino acid sequences of aniline dioxygenases from *Frateuria* sp. ANA-18 and *Delftia* sp. AN3 were selected for comparative analysis owing to the highest similarity.

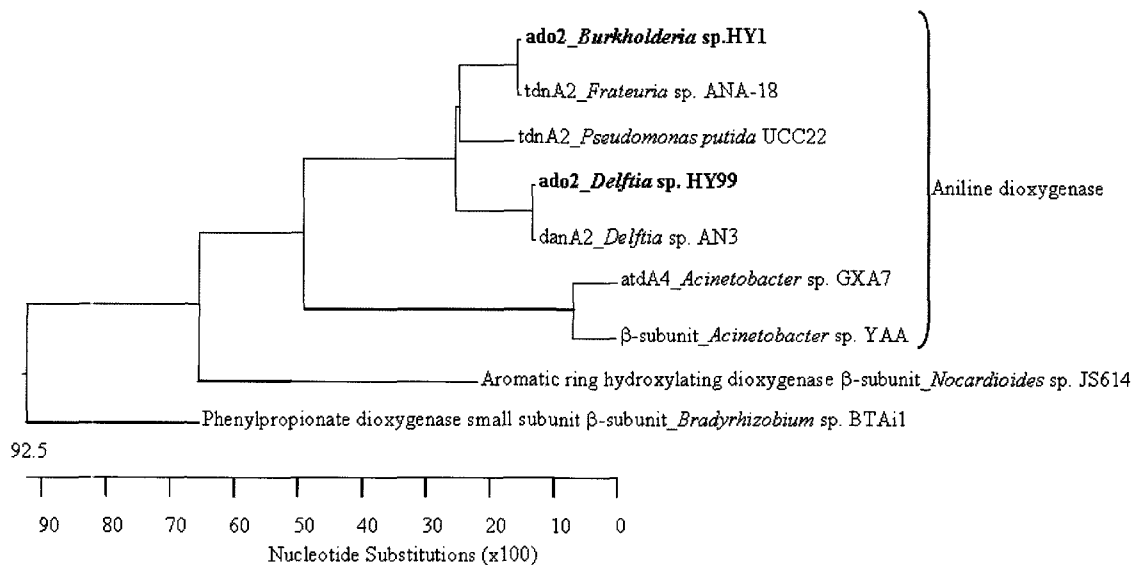


Fig. 5. Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of two aniline dioxygenases from *Burkholderia* sp. HY1 and *Delftia* sp. HY99.

*Frateuria* sp. ANA-18의 *tdnA2*[18]와 99%, *Pseudomonas putida* UCC22의 *tdnA2*[4]와 88%, *D.* sp. AN3의 *danA2* [14]와 81%, *Acinetobacter* sp. GXA7의 *atdA4*(Accession no. AY877266.1)와 52%, *A.* sp. YAA의 aniline dioxygenase

$\beta$ -subunit[5]와 50% 등의 순서로 근연관계를 나타내었다 (Fig. 5). 그리고 *Nocardioides* sp. JS614의 aromatic ring의 hydroxylation에 관련된 dioxygenase  $\beta$ -subunit[16]와 49%, phenylpropionate 분해능을 가진 *Bradyrhizobium* sp. BTAi1

(Accession no. ZP\_00863447)에서 밝혀진 phenylpropionate dioxygenase small subunit의  $\beta$ -subunit와 42%의 상동성을 나타내었다. Aniline을 catechol로 전환하는데 관련된 *Frateruria* sp. ANA-18의 aniline dioxygenase는 *tdnQ*, *tdnT*, *tdnA1*, *tdnA2*, *tdnB* 등 여러 유전자가 클러스터를 구성하고 있는 것으로 보고된 바 있으며[18], 그 중 aniline dioxygenase의 terminal dioxygenase는 large subunit인 *tdnA1*과 small subunit인 *tdnA2*로 구성되어 있다. 따라서 *Burkholderia* sp. HY1로부터 얻어진 *ado2*는 aniline dioxygenase의 terminal dioxygenase에 속하는 것으로 추정된다. *D. sp.* HY99에서 유래된 *ado2*는 *D. sp.* AN3의 *danA2*와 99% 이상의 아미노산 유사도를 나타내었는데, 이 유전자 또한 aniline dioxygenase의 terminal dioxygenase에 속하는 것으로 small subunit인 것으로 판단된다.

본 연구에서 대장균주로 사용한 *B. sp.* HY1와 *D. sp.* HY99 사이에는 16S rRNA를 기준으로 약 87%의 상동성이 있는 것으로 조사된 바 있다. 이들 두 균주에서 얻어진 aniline dioxygenase의 small subunit를 암호화하는 146개 아미노산을 기준으로 약 79%의 상동성을 나타내어 16S rRNA를 기준으로 하였을 때 보다 근연관계에 있어 좀 더 먼 거리차를 나타내었으며, aniline dioxygenase의 서열비교에 의한 두 균주 간의 근연관계는 보다 심층적인 연구를 통하여 보강되어야 할 필요가 있는 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 처음 보고된 *B. sp.* HY1의 aniline dioxygenase의 small subunit *ado2*와 *F. sp.* ANA-18의 *tdnA2* 사이의 99% 이상의 높은 아미노산 상동성은 두 균주 간의 진화관계에 대한 흥미로운 점을 시사해주고 있다.

## 요 약

본 연구에서는 단일 탄소원과 질소원으로 aniline을 이용하는 것으로 보고된 바 있는 *Burkholderia* sp. HY1과 *Delftia* sp. HY99로부터 aniline의 첫 번째 분해 단계에 관련된 aniline dioxygenase의 위치를 확인하고 그 유전자를 클로닝하여 아미노산 서열을 결정하고 비교하였다. 한 개 이상의 플라스미드 DNA를 포함하고 있을 것으로 조사된 *B. sp.* HY1에서 유래된 플라스미드의 curing 실험을 통해, *B. sp.* HY1의 aniline oxygenase는 플라스미드가 아닌 염색체 DNA에 존재하는 것으로 확인되었다. *B. sp.* HY1과 *D. sp.* HY99에서 유래된 aniline dioxygenase small subunit는 146개 아미노산을 기준으로 약 79%의 상동성을 보였다. 특히, *B. sp.* HY1으로부터 얻어진 *ado2*는 aniline dioxygenase small subunit의 terminal dioxygenase에 속하는 것으로 *Frateruria* sp. ANA-18의 *tdnA2*와 99%, 그리고 *Delftia* sp. HY99의 *ado2*는 *Delftia* sp. AN3의 *danA2*와 99% 이상의 아미노산 상동성을 나타내었다. 또한 본 연구에서 두 균주에서 얻어진 catechol oxygenase의 아미노산 서열분석을 통

해 *B. sp.* HY1은 catechol 1,2-dioxygenase에 의해 *ortho* pathway를 *D. sp.* HY99는 catechol 2,3-dioxygenase에 의해 *meta* pathway를 운영할 것이라는 이전 보고를 강력하게 뒷받침해 주었다.

## 감사의 글

본 논문은 2005년도 순천대학교 학술연구 조성비 일반연구 지원에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

1. 김현주, 김성은, 김정건, 김진철, 최경자, 김홍태, 황인규, 김흥기, 조광연, 이선우. 2003. *Delftia acidovorans*로부터 aniline 분해관련 유전자의 분리. 한국미생물생명공학회지 **31**: 25-31.
2. Aoki, K., K. Ohtsuka, and R. Shinke. 1984. Rapid biodegradation of aniline by *Frateruria* species ANA-18 and its aniline metabolism, *Agric. Biol. Chem.* **48**: 865-872.
3. Aoki, K., Y. Nakanishi, S. Murakami, and R. Shinke. 1990. Microbial metabolism of aniline through a *meta*-cleavage pathway: Isolation of strains and production of catechol 2,3-dioxygenase, *Agric. Biol. Chem.* **54**: 205-206.
4. Fukumori, F., and C. P. Saint. 1997. Nucleotide sequence and regulational analysis genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1), *J. Bacteriol.* **170**: 399-408.
5. Fujii, T., T. Masahiro, and M. Yoshimichi. 1997. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology* **143**: 93-99.
6. Itoh, N., M. Naoki, and K. Tokyo. 1993. Oxidation of aniline to nitrobenzene by nonheme bromoperoxidase. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* **29**: 785-791.
7. Kahng, H.-Y., J. J. Kukor, and K.-H. Oh. 2000. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 215-221.
8. Kahng, H.-Y., J. J. Kukor, and K.-H. Oh. 2000. Physiological and phylogenetic analysis of *Burkholderia* sp. HY1 capable of aniline degradation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 643-650.
9. Kahng, H.-Y., S.-I. Kim, M.-J. Woo, Y.-K. Park, and Y.-N. Lee. 1992. Isolation and characterization of aniline-degrading bacteria. *K. J. Microbiol.* **30**: 199-206.
10. Kearney, P. C., J. R. Plimmer, and F. B. Guarida. 1969. Mixed chlorobenzene formation in soil. *J. Agric. Food Chem.* **17**: 1418-1419.
11. Kim, S.-I., J. J. Kukor, K.-H. Oh, and H.-Y. Kahng. 2006. Evaluating the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1. *Enzyme Microbiol. Technol.* **40**: 71-78.
12. Lederberg, J., and E. M. Lederberg. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **3**: 399.
13. Liang, Q., M. Takao, M. Chen, W. Chang, Y. Xu, and M.

- Lin. 2005. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9. *Microbiology* **151**: 3435-3446.
14. Liu, Z., H. Yang, Z. Huang, P. Zhou, and S. J. Liu. 2002. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 679-682.
15. Lyons, C. D., S. Katz, and R. Bartha (1984), Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 491-496.
16. Mattes T. E., N. V. Coleman, J. C. Spain, and J. M. Gossett. 2005. Physiological and molecular genetic analyses of vinyl chloride and ethene biodegradation in *Nocardioides* sp. strain JS614. *Arch. Microbiol.* **183**: 95-106.
17. Minard, R. D., S. Russel, and J. M. Bollag. 1977. Chemical transformation of 4-chloroaniline to a trizene in a bacterial culture medium. *J. Agric. Food. Chem.* **25**: 841-844.
18. Murakami, S., T. Hayashi, T. Maeda, S. Takaenaka, and K. Aoki. 2003. Cloning and functional analysis of aniline dioxygenase gene cluster, from *Frateuria* species ANA-18, that metabolizes aniline via an *ortho*-cleavage pathway of catechol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 2351-2358.
19. Nozaki, M. 1970. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods Enzymol.* **17**: 522-555.
20. Patel, R. N., 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.
21. Rheinwald, J. G., A. M. Chakrabarty, and I. C. Gunsalus. 1973. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas Putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 885-889.
22. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, USA.
23. Urata, M., E. Uchida, H. Nojiri, T. Omori, R. Obo, N. Miyaura, and N. Ouchiyama. 2004. Genes involved in aniline degradation by *Delftia acidovorans* strain 7N and its distribution in the natural environment. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 2457-2465.

(Received Apr. 30, 2007/Accepted May 31, 2007)