

Sphingomonas sp. SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 16 ชนิดที่ถูกจัดเป็นสารมลพิษอันดับต้น แต่ไม่สามารถเจริญโดยใช้พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ ได้ โคลนที่มียีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์นี้ถูกคัดแยกได้โดยใช้ความสามารถในการออกซิไดซ์อินโดลเป็นอินดิโก ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสองมีความเหมือนสูงสุดกับหน่วยย่อยแอลฟา (ArhA1) และบีตา (ArhA2) ของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. A4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ทั้งอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลินได้ การวิเคราะห์หน้าที่ของ *arhA1arhA2* ของสายพันธุ์ SP2 ในฐานะที่เป็นเทอร์มินัลอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสถูกยืนยันโดยการทำไบโอทรานส์ฟอร์เมชันและการแสดงออกใน *E. coli* การแทรกสอดเพื่อไม่ให้ทำงานได้ของยีน *arhA1* แสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีความสำคัญสำหรับการย่อยอะซีแนพรีน การวิเคราะห์ RT-PCR และ real-time PCR ระบุว่าทรานส์คริปชันของยีน *arhA1* ของสายพันธุ์ SP2 ถูกชักนำด้วยอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลิน นอกจากนี้ยีน *arhR arhA3* และ *arhA4* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนควบคุม เฟอร์รีดอกซิน และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของไดออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 ก็ถูกแยกได้โดยวิธี PCR และ genome walking การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ของยีนเหล่านี้เหมือนกับยีนจากสายพันธุ์ A4 99-100% ซึ่งน่าสนใจว่า sphingomonads สองสายพันธุ์ซึ่งมีความแตกต่างในความจำเพาะต่อสับสเตรทมีเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่เหมือนกันมาก โครงสร้างของ ArhA1 จาก Sphingomonads ทั้งสองถูกทำนายและเปรียบเทียบโดยใช้ลำดับกรดอะมิโน และใช้โครงสร้างสามมิติของแอนทราซีนเป็นต้นแบบ ผลที่ได้พบว่าส่วนกรดอะมิโนที่แตกต่างของทั้งสองโปรตีน (Met261, Ser347 in ArhA1_{SP2} and Thr261, Gly347 in ArhA1_{A4}) อาจอยู่ในบริเวณทางเข้าจับของสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน

Project Code : MRG4980010

Project Title : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACENAPHTHENE

DIOXYGENASE GENES OF *Sphingomonas* sp. SP2

Investigator : Onruthai Pinyakong, Chulalongkorn University

Pairoh Pinphanichakarn, Chulalongkorn University

E-mail Address : onruthai@gmail.com

Project Period : 2 years

Sphingomonas sp. SP2 has been found to have ability to degrade acenaphthene, one of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons classified as priority pollutants, but it cannot grow on other PAHs. The clone containing genes encoding α and β subunits of terminal oxygenase of this strain was isolated by using the ability to oxidize indole to indigo. The amino acid sequences of both proteins exhibited highest homology (99%) to those of the α (ArhA1) and β (ArhA2) subunits of terminal oxygenase from *Sphingomonas* sp. A4, a strain capable of utilizing both acenaphthene and acenaphthylene. Functional analysis of *arhA1arhA2* of strain SP2 as terminal acenaphthene dioxygenase was confirmed by biotransformation and expression in *E. coli*. Insertion inactivation of the *arhA1* gene revealed that this gene is necessary for acenaphthene degradation. RT-PCR and real-time PCR analyses indicated that transcription of *arhA1* gene of strain SP2 was induced in the presence of acenaphthene and acenaphthylene. Furthermore, *arhR*, *arhA3* and *arhA4* genes encoding regulatory protein, ferredoxin and ferredoxin reductase of dioxygenase from strain SP2 were also identified by means of PCR and genome walking. Sequences analysis revealed that products of these genes have 98-99% homology to those from strain A4. It is interesting that these two sphingomonads which are different in their substrate specificity possess terminal oxygenase with high identical protein. Comparative structure prediction of ArhA1 from both sphingomonads was analyzed from their amino acid sequences by using known three-dimensional structure of naphthalene dioxygenase as a model. The result revealed that two different amino acid residues (Met261, Ser347 in ArhA1_{SP2} and Thr261, Gly347 in ArhA1_{A4}) might be located within active site-entrance region of enzyme and this might be one of the key factors causing these enzymes to have some difference in substrate specificity.